

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE**

**JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 9 月 15 日 第 11 卷 第 9 期

(Volume 11 Number 9)



**9/2003**

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.



# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2003 年 9 月 15 日 第 11 卷

第 9 期 (总第 113 期)

述 评	1269 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升, 尚克中 1273 胃食管反流病的内镜缝合治疗 杨云生, 令狐恩强
胃 癌	1275 $\alpha$ -连接素表达与胃癌生物学行为的关系 徐采朴, 周永宁, 陈渝 1279 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访 王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本俨, 尤纬缔 1282 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗 潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田 1286 PKC $\beta$ 1 和 PKC $\beta$ 2 在早期胃癌中的表达 冯瑞娥, 陈杰, 崔全才, 詹阳, 王振宇 1290 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响 张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 梁晓秋 1294 胃黏膜癌变过程中 PTEN 基因编码产物的表达及意义 李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东璘, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉 1297 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系 黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识 1302 雌激素诱导基因 PS2/TFF1 在胃癌及癌前病变中的表达 李俊美, 罗和生, 姚宏昌 1306 GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联 张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆 1310 基质金属蛋白酶-7 表达与胃癌临床病理生物学行为的关系 孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌 1314 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联 叶梅, 刘君炎, 邓长生 1318 胃癌中医证型相关基因的表达谱 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平
肝 癌	1322 MUC1 基因免疫抑制 H22 肝癌生长的实验研究 袁时芳, 王岭, 李开宗, 颜真, 韩苇, 张英起 1326 纺锤体组装关卡基因 hsMAD2 在人肝细胞肝癌中的表达及其意义 李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟 1329 GnRH 类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究 刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙岚, 黄鲁豫, 张远强 1333 bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控 于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧 1337 经肝动脉注射 5-FU 白苕微球治疗兔 VX <sub>2</sub> 移植性肝癌 李欣, 冯敦生, 郑传胜, 柳曦, 孔健 1341 KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响 司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平 1345 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化 赵海磊, 刘成, 赵爱光 1349 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究 代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁 1353 复方中药 99-克星超声介入治疗肝癌裸鼠移植瘤凋亡与增生 林晓东, 林礼务, 何以教, 高上达, 杨发端, 薛恩生 1357 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建 刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超 1362 $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 在肝癌肝内转移中的作用 苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 石明 1365 DC 负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答 郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德 1369 TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用 李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平
大 肠 癌	1372 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究 吴正蓉, 申洪 1375 IL-4 增强 IL-2 活化的 A-NK 细胞对人直肠癌 CC95 的抗肿瘤作用 王志华, 申宝忠, 史历 1378 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选 刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰 1382 直肠癌组织 CD44v6, DNA 含量的联合检测及临床意义 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍 1385 胃泌素拮抗剂增加 CD 自杀基因对结直肠癌细胞的杀伤作用 王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青 1389 aFGF 和 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 PKC 及 ERK 活性的影响 尚海, 张颐, 单吉贤
基础 研究	1392 牛磺酸对 CCl <sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究 梁健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海锋, 梁劲松, 黄仁彬, 韦新, 韦明 1396 胰腺移植 ICAM-1 的表达及信号转导的因素 梁健, 王凤山, 刘永锋, 刘利民, 刘树荣, 崔宏, 邵春泉, 何三光



临床研究	1399 聚乙二醇 4 000 治疗老年人功能性便秘 85 例 张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其
焦点论坛	1402 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗 程英升 1402 胃肠道肿瘤的 X 线诊断 尚克中, 程英升, 吴春根 1404 胃肠道肿瘤 CT 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1406 胃肠道肿瘤 MRI 诊断 吴春根, 程英升, 尚克中 1408 胃肠道肿瘤超声诊断 胡兵, 周进祝 1410 胃肠道肿瘤核素诊断 陆汉魁 1413 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗 程英升, 尚克中
治疗指南	1416 肝细胞癌的诊断和治疗 陆嵘, 房静远
文献综述	1420 DNA 高甲基化与抑癌基因 刘仲敏, 刘芝华, 吴旻 1425 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展 沈波, 朱金水 1429 腹膜粘连的分子机制及药物防治 曾健, 李晓辉 1433 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展 姚学清, 林锋 1436 肽转运载体的分子特征 韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽 1443 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展 蒋业贵, 李兆申 1447 环氧化酶-2 与结直肠癌 姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟 1451 幽门螺杆菌疫苗的研究进展 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙 1457 脂肪酸结合蛋白研究进展 冯爱娟, 陈东风 1460 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展 王永刚, 王宇明
读者来信	1352 陈祖林 1368 汤伟
消息	1301 欢迎订阅 2004 年度世界华人消化杂志 1332 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology® 1424 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊 1450 WJG 搭建我国消化基础 and 临床研究惟一国际交流的平台 1464 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助
封面故事	巴松湖又名错宗湖, 在藏文里又是绿色湖水的意思, 位于西藏林芝地区工布江达县境内, 该湖湖面海拔 3464 m, 是川藏东部最大的淡水堰塞湖之一。湖水清澈见底, 四周雪山倒映其中, 湖周原始森林密布, 群山环绕, 景美如画。湖中央飘着一座秀丽的湖心小岛, 湖心岛上有一座错宗寺, 建于唐代末年。(马俐 马娜 摄影)。

## 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(月刊)

创刊 1993-01-15

改刊 1998-01-25

出版 2003-09-15

原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀

黄象谦

黎介寿

刘耕陶

裘法祖

汤钊猷

王宝恩

危北海

吴孟超

吴咸中

张金哲

张学庸

赵东海

周殿元

社长总编辑 马连生

中文编辑 潘伯荣

王瑾晖

英文编辑 王先林

排版 李少华

校对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

030001, 山西省太原市双塔西街 77 号

E-mail: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社

100023, 北京市 2345 信箱

E-mail: wjcd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

电话 (010)85381892

传真 (010)85381893

印刷 北京科信印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局

国外 中国国际图书贸易总公司

(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局

邮购 世界胃肠病学杂志社发行部

(100023, 北京市 2345 信箱)

电话: (010)85381892

传真: (010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外

检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》

荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》

俄罗斯《文摘杂志(PJ)》

中国科技论文统计与分析

中国学术期刊文摘

中国中医药信息服务网

中国生物医学文献光盘数据库

《中文科技资料目录(医药卫生)》

中国生物医学期刊目次数据库

中国医学文摘外科学分册(英文版)

中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠

病学杂志社和本刊编委会的观点, 除

非特别声明, 本刊如有印装质量问题,

请向本刊编辑部调换。

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证

1401004000050

www.wjgnet.com

# 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗

程英升, 尚克中

程英升, 尚克中, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233  
程英升, 男, 1966-12-06 生, 安徽省合肥市人, 汉族. 1996 年上海第二医科大学影像医学硕士毕业, 2002 年上海交通大学生命科学技术学院在读博士, 主治医师. 主要从事消化系统疾病的影像诊断和介入治疗的研究, 兼科教管理工作.  
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

程英升, 尚克中. 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1269-1272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1269.asp>

## 0 引言

近年来, 随着科学技术的快速发展, 医学影像学的新设备不断出现, 新技术迅速发展, 使胃肠道肿瘤和其他病变的影像诊断进入了一个方法更便捷、图像更清楚、判断更准确的新时期. 胃肠道现代影像学检查从原有的简单图像向数字图像发展, 不断有所突破和创新. 现代主要胃肠道影像检查的手段有: 包括双对比(double contrast, DC)和单对比(single contrast, SC)组成的钡剂造影检查(barium examination, 钡检), 动态录像造影(dynamic videofluoroscopy), 数字胃肠成像系统(digital GI imaging system), 数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA), 计算机体层摄影(CT), 仿真内镜 CT(CT virtual endoscopy, CTVE or CTE), 磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、CT 或 MRI 的结肠造影或小肠灌肠造影(CT/MRI colonography /enteroclysis), 超声成像(ultrasonography, US)和内镜超声(endoscopic ultrasonography, EUS), CT 或超声导向下的活检, 放射性核素显像(radionuclide imaging)包括单光子发射计算机体层摄影(single photon emission CT, SPECT)和正电子发射体层摄影(positron emission CT, PET)等, 都是诊断胃肠道肿瘤及其他病变主要的或重要的方法<sup>[1-22]</sup>. 胃肠道肿瘤介入治疗是近 20 a 发展起来的一项微创技术, 对肿瘤的术前、术后、复发和姑息治疗具有较大的价值. 根据介入治疗引入途径胃肠道肿瘤介入治疗分经皮、经血管、经管腔介入治疗; 根据监视或引导设备分放射(含普通 X 线、DSA、CT、MR)介入、内镜介入、超声介入等; 根据治疗方法分灌注术、栓塞术、成形术、灭能术或注射术、射频消融术、激光术、微波术等. 目前多为以上各种方法综合应用, 其中在 DSA 监视下的以经动脉的胃肠道肿瘤灌注或栓塞术和以 X 线监视下或内镜引导下的胃肠道恶性梗阻金属内支架扩张术在胃肠道肿瘤介入治疗应用最为广泛.

## 1 主要影像诊断手段的价值和新进展

1.1 钡检 钡检是诊断胃肠道腔内病变的基本方法. 近 20 a 发展很快, 低张双对比造影、双对比造影原理、国产钡剂的研制、插管法小肠钡剂灌肠等方面的研究和应用, 大大提高诊断的敏感性和特异性, 通过不断的优化方法、规范操作, 实现钡检由经验型向科学型、传统型向现代型的转变, 使早期、盲区(小肠)得以显示. 在各种影像检查方法中, 钡检的历史最长、应用最广, 现代的双对比造影对胃肠道肿瘤的检出率可达 98 % 左右. 钡检现正面临内镜的竞争而逐渐将重点向可评价胃肠道功能异常的胃肠道动态造影以及不需拍片、可作图像后处理且放射剂量较小的数字化成像的方向发展<sup>[1-7]</sup>. 以双对比为代表的钡检虽能充分显示腔壁特别是黏膜的病变, 但不能直接显示肿瘤侵犯腔壁的深度和进行 TNM 分期, 所以近年来胃肠道肿瘤影像诊断的报道多将钡检与 CT 等其他影像手段结合以进行准确的肿瘤手术前分期. 由于双对比影像能清楚显示病变的优势并已被多数医师认同和熟悉, 故近来发表了不少用 CT 和 MRI 作胃肠道扫描后再将其图像经三维处理转变为双对比影像研究的报道<sup>[18, 19]</sup>.

1.2 CT CT 常用于胃和结肠的诊断, 随着螺旋 CT 的不断应用和胃肠道造影剂应用的普及, 扩大了 CT 在胃肠道的应用范围. CT 对胃肠道肿瘤治疗前 TNM 分期和治疗后复发情况的随访极为重要, 已被一些国外医院列为手术前的常规检查. 自 1994 年开始, CT 的二维成像和三维成像功能已可应用于代替结肠钡剂灌肠, 作 CT 结肠造影(CT colonography), 有代替双对比的趋势<sup>[16-18]</sup>. Lee et al<sup>[23]</sup>报告的 12 例结、直肠平滑肌瘤或肉瘤, 作 DC 检查者仅 4 例, 其余各例均经 CT 或 MRI 明确诊断. 而且, 随着技术的日渐成熟, CT 结肠造影有可能被美国“医保”(MediCare)采用为结直肠癌筛查主要方法之一<sup>[16, 17]</sup>. 应当注意, 单用常规 CT 诊断胃肠道肿瘤无大价值, Peng et al<sup>[24]</sup>报道一组 14 例胃黏膜相关淋巴瘤组织淋巴瘤(MALT), CT 发现病变者仅 30 %, 而钡检发现者达 88 %.

1.3 MRI 较早期的 MRI 因成像时间很长, 故不适用于经常有移动(自身蠕动并受呼吸动作推动)而致影像模糊的胃肠道器官. 近年来, 出现了脂肪抑制、“快速”(FLASH)等技术, 可在一次屏息(约 19 s)中获取 14 幅分层的图像; 加之 MRI 具有以不同强度的信号显示不同组织成分的能力、可作矢状、冠状和横断任何平面的成像以及无放射性等优点, 对胃肠道肿瘤的诊断提供了一



条有重要价值的新途径. 现已有用 MRI 作小肠灌肠检查, 清晰显示小肠肿瘤以及经三维处理形成结肠双对比造影的报道<sup>[17, 18, 21, 23]</sup>.

1.4 DSA DSA 可用于食管癌、胃癌、小肠平滑肌瘤、结肠癌等肿瘤血管造影诊断, DSA 对肿瘤血管的观察有独特优越性, 可依据病理血管的范围确定肿瘤的大小、部位, 并决定手术切除范围, 通过观察血管变化来判断介入治疗的效果. DSA 虽能提供更多有价值的信息, 同时也会增加患者的危险性. 故近年来 DSA 在胃肠道肿瘤的诊断中逐渐被无或少损伤的胃肠造影、CT、MRI、超声等技术所代替.

1.5 US 和 EUS 超声在空气中的声阻抗(Z)仅为软组织的  $\pm 0.003\%$ , 不能形成回声. 因胃肠道腔内常有较多气体, 除非采用某些特殊技术, 不能应用普通 US 作诊断. 而 EUS 可清楚显示腔壁的黏膜、肌层、浆膜各层及各层受累的程度和范围, 对肿瘤的 T 分期和 7 cm 以内的 N 分期极有价值<sup>[25-30]</sup>. 在内镜基础上发展的新技术光聚体层(optical coherence tomography, OCT)可精确显示 0.7-0.9 mm 深度的黏膜和黏膜下层的细微结构如食管腺、肠绒毛、小血管等, 高频率导管探头(20 MHz or 30 MHz catheter probe)EUS 扩大了探索的范围<sup>[25]</sup>. EUS 判断残胃恶性肿瘤的敏感性和特异性分别达 72.7% 和 85.4%, 良性肿瘤分别达 80.5% 和 100%<sup>[26]</sup>. Chen et al<sup>[28]</sup> 报告用 EUS、经腹 US 及 CT 三种检查方法检查壶腹区肿瘤 74 例, 在检出率(EUS 97%; US 24%; CT 39%)、T 分类(EUS 72%: US 11%: CT 22%)、淋巴结转移检出(EUS 47%: US 7%: CT 33%)和显示血管受侵犯(EUS 100%: US 0%: CT 33%)等方面 EUS 均属最优, CT 次之, US 最差; 但 EUS 不能显示远处转移.

1.6 核医学 核医学诊断近年来在 2 个方面取得重要进展: 第一, 将功能测定与形态显示结合起来, 如 SPECT, PET, 综合核素示踪与 CT 扫描的优点, 能准确、清晰地显示病变的动态功能图像. 第二, 将抗肿瘤的单克隆抗体用放射核素标记后进行放射免疫显像; 或利用放射免疫生化物质或受体药物, 以追踪脏器组织在分子水平上的异常生化变化或受体缺陷等. 核素检查对胃肠道的原发肿瘤及其转移灶有较高的敏感性和特异性, 但因肿瘤的组织学功能和检查技术不同而有较大差异. 例如, 一组用  $^{18}\text{F}$ -FDG PET 检查的胃和食管癌 16 例, 全部病例的原发肿瘤(T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>)均可显示, 但对转移淋巴结(N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>)的显示较差. 小肠淋巴瘤, 有时其他各种影像手段均难发现, 而核素是惟一可以查出的方法. Yasuda et al<sup>[31]</sup> 报告 30 例 59 个经全结肠镜检查证实的 5-30 mm 大小的腺瘤性息肉, PET 发现者 14 个(24%), 但对较大(13 mm 以上)并有潜在恶性的腺瘤的检出率则高达 90%, 假阳性 5.5%, 有实用价值. 利用类癌(carcinoid)具有神经内分泌功能的特性, 可用  $^{111}\text{In}$  对胃肠道的此类肿瘤进行准确的定位和定性<sup>[32]</sup>. 核医学可以检测肿瘤对化疗药物的回应以预测其疗效. Weber et al<sup>[33]</sup> 报告 40 例胃食

管连接部腺癌用标记的氟脱氧葡萄糖(fluorine-18 fluorodeoxyglucose,  $^{18}\text{F}$ -FDG)进行初始化疗后再作 FDG PET, 提出将其代谢回应(metabolic response)的 35% 定为预测药物化疗疗效的转换值(cutoff value), 敏感性和特异性分别达 93% 和 95%; 可据以预测化疗效果, 避免延误手术. 利用肿瘤单克隆抗体的特异性, 可查出黑色素瘤的转移灶, 在报告的一组 17 例黑色素瘤中查出 15 例有转移<sup>[34, 35]</sup>. Lerut et al<sup>[36]</sup> 报道 42 例食管和食管胃连接部癌, 将 FDG PET 检查的结果与 CT、EUS 二法检查的结果比较, 对显示局域性淋巴结(N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>)侵犯的准确性, FDG 低于后者(48% vs 69%), 但对远处淋巴结转移则较后者高(86% vs 62%). 以上资料均可说明各种影像手段互补作用的重要.

## 2 导向活检

在 CT 或 US 导引下经皮穿刺, 吸取肿瘤组织进行活检, 可对肿瘤的组织学作出准确的定性诊断, 近来出现了在胃肠道内经 EUS 导向作胃肠道及其邻近肿瘤的活检或引流的新技术<sup>[29, 30]</sup>.

## 3 临床应用、价格效益比与科学研究

这些影像学检查手段都有各自的优势、限度或不足. 在临床实际工作中, 在患者可能接受的检查次数和检查费用都是相对有限的情况下, 在“医保”办法正在我国普遍实施的今天, 影像医师与临床医师应经常互相沟通, 交换信息和要求, 选择最适合的影像检查方法, 用较少的检查项目和较低廉的检查费用使患者获得比较准确和全面的诊断. 例如, 胃肠道结构性病变如肿瘤等均应作常规钡检, 发现有较大的恶性肿瘤时再作 CT 或 EUS 检查进行分期, 而不应将后者代替钡检或后作钡检.

还应了解, 有些检查手段的限度和不足常是由于设备较陈旧或设备的潜在能力未发挥所致. 通过设备更新、技术改进和科学研究, 可使原来不适宜于某项检查的影像检查手段变为适宜. 例如, 经过新技术改进后的 MRI 已可对胃肠道病变作出很有价值的诊断. 在新技术研究过程中, 常需要用多种影像检查手段对同一病变进行多次比较性的检查, 否则就没有技术的发展. 本文引用的文献多数都是多种影像检查结果的比较.

将多种现代影像设备如透视 - 超声(fluoro-US)、透视 - CT(fluoro-CT)、透视 - 磁共振(fluoro-MR)、CT 血管造影(CT - angiography)等置于同一房室之内, 可在较短的一段时间内进行透视、摄影、造影、穿刺活检等检查, 根据某种影像检查的发现, 随即采用下一个必要的检查, 称这种连续、紧凑、有序、高效的影像检查为集成影像检查(integration imaging modalities), 可互相补充, 密切衔接, 显著减少检查时间、避免重复检查, 明显提高影像诊断的协同性效果<sup>[1, 19]</sup>.



## 4 介入治疗

4.1 经血管灌注术或栓塞术<sup>[37-50]</sup> 胃肠道肿瘤的血管内介入治疗主要以经导管动脉药物灌注术(transcatheter arterial infusion, TAI)和经导管动脉栓塞术(transcatheter arterial embolization, TAE). TAI 是通过导管经动脉注入各种不同的药物到病变的组织或器官, 以达到疗效高而副作用轻的治疗效果. TAI 的基本方法为经动脉内插管直接至靶动脉, 再以等量或少于静脉给药的药剂量进行动脉内灌注, 就能使靶器官药物浓度提高和延长药物与病变的接触时间, 而外周血药浓度并不明显增加, 从而达到提高疗效和减少副作用的目的. TAE 是指将某种固体或液体栓塞物质通过导管选择性有控制地注入到某一病变或器官的供应血管内, 使之发生闭塞, 中断血供, 以达到预定治疗目的的一项技术. TAI 和 TAE 主要在放射设备引导下完成. TAE 和 TAE 已应用近 20 a, 在胃肠道肿瘤的介入治疗中, 他们可以单独应用, 也可联合应用. 对胃肠道肿瘤患者, 手术前行 TAI 或 TAE, 可使巨大肿瘤缩小, 方便手术; 减少肿瘤出血; 降低手术前或手术中肿瘤转移发生几率. 手术后行 TAI 或 TAE, 可减少或降低肿瘤复发率. 对失去手术机会的患者, 可提高治疗效果、改善生活质量和延长生存期, 具有重大意义. 近几年经血管灌注术或栓塞术的主要技术改进有超选择血管插管术、高温生理盐水灌注术、经皮血管内导管药盒系统植入术.

4.2 经腔的腔道狭窄或梗阻成形术<sup>[51-65]</sup> 腔道狭窄或梗阻成形术是指通过人体天然生理通道通过球囊或支架等扩张器材完成狭窄或梗阻的腔道再通恢复生理功能的技术. 腔道狭窄或梗阻成形术主要在放射设备或内镜引导下完成. 球囊扩张术主要用于良性腔道狭窄的治疗; 支架扩张术既可用于恶性腔道狭窄的治疗, 也可用于良性腔道狭窄的治疗. 胃肠道肿瘤的梗阻主要是恶性狭窄, 对他的治疗主要使用金属内支架扩张术. 腔道成形术作为微创介入医学领域的一项高新技术, 因其具有创伤小、并发症少、疗效显著而持久等特点, 在国内外已得到广泛应用和迅猛发展, 并显示了广阔的应用前景.

4.3 经皮或经腔的肿瘤灭能术或注射术<sup>[37, 66]</sup> 肿瘤灭能术或注射术是将能够使肿瘤蛋白变性的物质直接注入到肿瘤组织内, 使肿瘤细胞坏死, 以达到局部治疗的方法. 肿瘤灭能术或注射术主要在超声、内镜和 CT 引导下完成. 灭能术主要使用的物质是无水乙醇和醋酸; 注射术使用的物质较多, 有无水乙醇、醋酸、抗癌药物、热水或热盐水、放射性核素、免疫制剂或治疗基因等.

4.4 经皮或经腔的肿瘤消融术<sup>[66]</sup> 肿瘤消融术主要有经皮射频间质热消融术(percutaneous radio-frequency interstitial thermal ablation, RITA)和经皮冷冻消融术(percutaneous cryoablation, PCA). RITA 为采用超声、CT 或 X 线引导下经皮穿刺途径, 将一与特高频辐射源相连接的辐射器内导体通过穿刺针深入瘤体中, 根据肿瘤大小选用相应的输出功率和频率, 将特高频电磁

场导入至肿瘤内施行辐射. 由于射频电磁波的热效应(90 °C)和非热效应可使肿瘤组织发生凝固坏死和血管闭塞, 达到杀伤瘤细胞的目的. PCA 是利用深度冷冻治疗机内压缩的液氮, 经输送泵进入留在瘤体深部的冷冻头, 使局部瘤灶达到极低温度(-196 °C), 从而使冷冻区域内肿瘤细胞和正常细胞发生不可逆的凝固性坏死, 达到杀伤瘤细胞的作用, 同时可使机体免疫机制增强.

4.5 经皮或经腔的肿瘤微波术或激光术<sup>[66]</sup> 经皮微波高温治疗(percutaneous microwave hyperthermia therapy, PMHT)为超声或内镜引导下采用经皮或经腔穿刺途径, 通过穿刺针置入一与微波组织凝固器相连接的微波电极针于瘤体中, 根据肿瘤大小选择相应的功率和发射时间发射微波进行治疗. 在微波作用下, 瘤内组织不断升温而致瘤细胞凝固坏死, 周围正常组织不受到影响. 经皮激光热疗(percutaneous laser-induced thermotherapy, LITT)是在超声、CT 和 MR 引导下经皮或经腔将激光光能转变为热能作用于肿瘤局部, 瘤组织在热能(42-45 °C)作用下, 生物膜的功能和状态发生改变, 溶酶体活性被激活, DNA、RNA 和蛋白质合成受到抑制, 而热休克蛋白合成增加, 从而起到选择性杀伤瘤细胞的作用, 正常细胞不受到损伤.

4.6 经皮或经腔的电化学治疗<sup>[37]</sup> 电化学治疗(electrochemical treatment, ET)是利用单相直流电使血管-间质电路(一种特异性连接血流和间质组织液的电路)系统成为非生理性的激活, 使局部组织结构发生特异化学反应, 可造成肿瘤生存不利条件, 致使肿瘤组织产生多种病理效应, 细胞核固缩、细胞膜崩溃、线粒体消失、核蛋白凝固坏死. ET 主要在内镜引导下治疗食管癌和直肠癌, 而较少用于胃癌或肠癌, 主要是 ET 的作用是在几个小时内即将肿瘤溶解坏死, 因此有可能并发胃肠道穿孔.

## 5 参考文献

- 1 Goldberg HI, Margulis AR. Gastrointestinal radiology in the United States: An overview of the past 50 years. *Radiology* 2000;216:1-7
- 2 程英升, 尚克中. 中国胃肠影像学发展的 50 a. *世界华人消化杂志* 2000;8:1225-1232
- 3 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第 1 版. 上海: 上海科技文献出版社, 1995:3-41
- 4 Shang KZ. Evolution of gastrointestinal double contrast radiography in China: researches, application and popularization. *World J Gastroenterol* 1998;4:197-201
- 5 程英升, 尚克中. 中华放射学杂志 46 a 胃肠影像学论著的回顾性分析与思考. *中华放射学杂志* 2001;35:725-730
- 6 尚克中, 程英升, 高玉洁, 李松年. 我国胃肠双对比造影的现状与应关注的问题. *中华放射学杂志* 2001;35:872-875
- 7 尚克中, 程英升, 吴春根, 庄奇新. 吞咽障碍患者咽和食管的动态造影. *世界华人消化杂志* 1999;7:52-54
- 8 尚克中, 李松年. 重视胃肠肿瘤治疗前的 CT 分期诊断. *中华放射学杂志* 1999;33:509-510
- 9 李松年. 胃肠道肿瘤影像学诊断的进展. *新消化病学杂志* 1997;5(特刊 6):14
- 10 李建国. 胃肠肿瘤超声检查. *中国超声医学杂志* 2000;16:213-217
- 11 陈九如. 胃肠道影像学检查的新进展. *中国医学计算机成像杂志* 1999;5:251-264
- 12 卢延. 合理应用胃肠道影像学检查. *中华放射学杂志* 1999;33:284-286



- 13 邓海军, 李国新, 齐德林. 直肠癌的术前影像学分期. 世界华人消化杂志 2000;8:797-799
- 14 Zalis ME, Hahn PF, Arellano RS, Gazelle GS, Mueller PR. CT colonography with telerradiology: effect of lossy wavelet compression on polyp detection--initial observations. *Radiology* 2001;220:387-392
- 15 Chaoui AS, Blake MA, Barish MA, Fenlon HM. Virtual colonoscopy and colorectal cancer screening. *Abdom Imaging* 2000;25:361-365
- 16 Bruzzi JF, Brennan DD, Fenlon HM. Trends in ct colonography. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3:437-445
- 17 Johnson CD, Dachman AH. CT colonography: the next colon screening examination? *Radiology* 2000;216:331-341
- 18 Callstrom MR, Johnson CD, Fletcher JG, Reed JE, Ahlquist DA, Harmsen WS, Tait K, Wilson LA, Corcoran KE. CT colonography without cathartic preparation: feasibility study. *Radiology* 2001;219:693-698
- 19 Luboldt W, Luz O, Vonthein R, Heuschmid M, Seemann M, Schaefer J, Stueker D, Claussen CD. Three-dimensional double-contrast MR colonography: a display method simulating double-contrast barium enema. *Am J Roentgenol* 2001;176:930-932
- 20 Maglinte DD, Siegelman ES, Kelvin FM. MR enteroclysis: the future of small-bowel imaging? *Radiology* 2000;215:639-641
- 21 Rogalla P, Bender A, Bick U, Huitema A, Terwisscha van Scheltinga J, Hamm B. Tissue transition projection (TTP) of the intestines. *Eur Radiol* 2000;10:806-810
- 22 Luboldt W, Luz O, Vonthein R, Heuschmid M, Seemann M, Schaefer J, Stueker D, Claussen CD. Three-dimensional double-contrast MR colonography: a display method simulating double-contrast barium enema. *Am J Roentgenol* 2001;176:930-932
- 23 Lee SH, Ha HK, Byun JY, Kim AY, Cho KS, Lee YR, Park HW, Kim PN, Lee MG, Auh YH. Radiological features of leiomyomatous tumors of the colon and rectum. *J Comput Assist Tomogr* 2000;24:407-412
- 24 Peng SS, Tsang YM, Lin JT, Wang HH, Chiang IP, Hsu JC. Radiographic and computed tomographic findings of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *J Formos Med Assoc* 1998;97:261-265
- 25 Neumaier CE, Cittadini G, Grasso A, Dahmane M. Role of ultrasonography in the staging of gastrointestinal neoplasms. *Semin Surg Oncol* 2001;20:86-90
- 26 Das A, Sivak MV Jr, Chak A, Wong RC, Westphal V, Rollins AM, Willis J, Isenberg G, Izatt JA. High-resolution endoscopic imaging of the GI tract: a comparative study of optical coherence tomography versus high-frequency catheter probe EUS. *Gastrointest Endosc* 2001;54:219-224
- 27 Tsai TL, Changchien CS, Hu TH, Hsiaw CM, Hsieh KC. Differentiation of benign and malignant gastric stromal tumors using endoscopic ultrasonography. *Chang Gung Med J* 2001;24:167-173
- 28 Chen CH, Tseng LJ, Yang CC, Yeh YH. Preoperative evaluation of periampullary tumors by endoscopic sonography, transabdominal sonography, and computed tomography. *J Clin Ultrasound* 2001;29:313-321
- 29 Inui K, Yoshino J, Okushima K, Miyoshi H, Nakamura Y, Watanabe S, Takashima T, Nakazawa S, Hattori T. EUS-guided one-step drainage of pancreatic pseudocysts: experience in 3 patients. *Gastrointest Endosc* 2001;54:87-90
- 30 Bhutani MS. EUS and EUS-guided fine-needle aspiration for the diagnosis of rectal linitis plastica secondary to prostate carcinoma. *Gastrointest Endosc* 1999;50:117-119
- 31 Yasuda S, Fujii H, Nakahara T, Nishiumi N, Takahashi W, Ide M, Shohtsu A. 18F-FDG PET detection of colonic adenomas. *J Nucl Med* 2001;42:989-992
- 32 Janson ET, Westlin JE, Ohrvall U, Oberg K, Lukinius A. Nuclear localization of 111In after intravenous injection of [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe1]-octreotide in patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 2000;41:1519-1521
- 33 Weber WA, Ott K, Becker K, Dittler HJ, Helmberger H, Avril NE, Meisetschlager G, Busch R, Siewert JR, Schwaiger M, Fink U. Prediction of response to preoperative chemotherapy in adenocarcinomas of the esophagogastric junction by metabolic imaging. *J Clin Oncol* 2001;19:3058-3065
- 34 McAteer D, Wallis F, Couper G, Norton M, Welch A, Bruce D, Park K, Nicolson M, Gilbert FJ, Sharp P. Evaluation of 18F-FDG positron emission tomography in gastric and oesophageal carcinoma. *Br J Radiol* 1999;72:525-529
- 35 Ullerich H, Franzius CH, Domagk D, Seidel M, Sciuk J, Schober, Domschke W. 18F-Fluorodeoxyglucose PET in a patient with primary small bowel lymphoma: the only sensitive method of imaging. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2497-2499
- 36 Lerut T, Flamen P, Ectors N, Van Cutsem E, Peeters M, Hiele M, De Wever W, Coosemans W, Decker G, De Leyn P, Deneffe G, Van Raemdonck D, Mortelmans L. Histopathologic validation of lymph node staging with FDG-PET scan in cancer of the esophagus and gastroesophageal junction: A prospective study based on primary surgery with extensive lymphadenectomy. *Ann Surg* 2000;232:743-752
- 37 李麟荪. 介入放射学. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 1999: 73-138
- 38 单鸿, 罗鹏飞, 李彦豪. 临床介入诊疗学. 第1版. 广州: 广东科技出版社, 1997: 6-40
- 39 王建华, 王小林, 颜志平. 腹部介入放射学. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1998: 119-123
- 40 张金山. 现代腹部介入放射学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2000: 239-249
- 41 朱晓玲, 李胜昔. 经肠系膜动脉导管治疗溃疡性结肠炎. 华人消化杂志 1998;6:705-706
- 42 郭建华, 焦旅忠, 王天. 导管化疗加放疗及X-刀治疗食管癌60例. 华人消化杂志 1998;6:603-605
- 43 陈宏伟, 黄裕新. 胃癌化学治疗的进展. 新消化病学杂志 1996;4:102-103
- 44 吴云林. 胃癌化疗及免疫治疗. 新消化病学杂志 1996;4:109-110
- 45 秦建民, 李荫太. 胃癌的介入放射学治疗. 新消化病学杂志 1997;5:399-400
- 46 刘福坤, 陈忠豪, 李国立, 祁晓平, 许哲, 黎介寿. 胃癌术前介入治疗后血管变化与癌组织坏死的关系. 华人消化杂志 1998;6:686-688
- 47 郑卫华, 郑佳冰. 中药结合介入化疗治疗晚期胃癌40例. 新消化病学杂志 1996;4:717
- 48 许健, 陈君坤, 刘福坤, 吴波, 黄伟, 曹建民, 李成郎. 大肠癌术前化疗疗效的病理组织学对照研究. 华人消化杂志 1998;6:891-893
- 49 周石, 石荣书, 王精兵, 马宁, 李兴, 宋杰, 尚国燕, 许绍雄. 经皮左锁骨下动脉插管. 实用放射学杂志 1998;14:208-209
- 50 黄金华, 吴沛宏, 张福君, 崔随平, 周毅. 经股动脉药盒导管植入系统治疗晚期恶性肿瘤. 中华肿瘤杂志 1999;21:386-388
- 51 程英升, 尚克中. X线下球囊导管扩张术治疗胃肠道狭窄. 介入放射学杂志 1996;5:109-111
- 52 程英升, 尚克中, 庄奇新, 李明华, 许建荣, 杨世坝. 食管良性狭窄介入治疗方法和再狭窄原因. 华人消化杂志 1998;6:791-794
- 53 方荣光, 韩志伟. 哑铃型气囊导管扩张治疗食管贲门狭窄. 华人消化杂志 1998;6:71
- 54 沈伟明, 赵云才, 沈翠英. 食管胃吻合口狭窄内镜下扩张53例. 新消化病学杂志 1996;4:599
- 55 蔡华, 方道连, 马祖圣. 食管胃吻合口狭窄52例内镜治疗. 新消化病学杂志 1996;4:112-113
- 56 郝俊鸣, 张月梅, 付克礼, 李晓霞. 食管贲门部狭窄内镜治疗254例. 新消化病学杂志 1996;4:595
- 57 潘雪, 陈桂荣, 高同胜, 黄静珍, 王玉萍. 内镜下国产扩张器治疗食管贲门狭窄25例. 新消化病学杂志 1997;5(特刊6):57-58
- 58 宛新建, 李兆申, 许国铭, 王雯, 张伟, 吴仁培. "Z"型及网状食管支架置入后的病理学比较研究. 世界华人消化杂志 2000;8:5-9
- 59 宛新建, 李兆申, 许国铭, 王雯, 湛先保, 刘婧. 食管"Z"型支架术后局部黏膜血流量及通透性变化分析. 世界华人消化杂志 2000;8:10-14
- 60 程英升, 尚克中. 食管自扩金属支架(SEMS)临床应用现状. 国外医学·临床放射学分册 1996;19:224-226
- 61 宋正军, 黎庶熙, 王巧银. 食管狭窄内镜下内支架治疗. 新消化病学杂志 1996;4:562-563
- 62 张祖良, 胡晓民, 王国辉, 马戎. 两种国产可伸展型食管金属内支架的比较和选择. 华人消化杂志 1998;6:938
- 63 刘变英, 栗彤, 李勇琴, 尹海萍, 梁翠珍, 刘胜武, 刘谦民. 带膜记忆合金支架治疗食管贲门良恶性狭窄30例. 世界华人消化杂志 1999;7:182-183
- 64 程英升, 杨仁杰, 李明华, 尚克中, 陈维雄, 陈尼维, 储榆德, 庄奇新. 上胃肠道良恶性狭窄或阻塞的介入治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:1354-1360
- 65 程英升, 杨仁杰, 茅爱武, 庄奇新, 尚克中. 胃肠道狭窄或梗阻内支架置入术常见并发症及其处理. 华人消化杂志 1998;6:856-858
- 66 欧阳墉, 李麟荪. 非血管性介入治疗技术概况. 第1版. 呼和浩特: 远方出版社, 1998: 137-145



# 胃食管反流病的内镜缝合治疗

杨云生, 令狐恩强

杨云生, 令狐恩强, 中国人民解放军总医院消化科 北京市 100853  
杨云生, 男, 1962-08-19 生, 河南省灵宝市人, 汉族. 1995 年第一军医大学  
博士研究生毕业, 1997 年第四军医大学博士后出站, 副教授. 临床从事消化  
内科学, 主要研究胃肠功能与动力性疾病及内镜诊疗新技术.  
北京市科技项目, No. H010910250113  
项目负责人: 杨云生, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院  
消化科. sunny888@medmail.com  
电话: 010-66937076 传真: 010-68154653  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-29

## 摘要

胃食管反流病内镜下缝合治疗是一项新开展的内镜治疗技术, 是在胃镜前端安装一种缝合器, 在胃镜下缝合胃壁组织, 以减少或防止胃肠内容物的反流, 起到治疗胃食管反流病的目的. 该技术具有创伤小、安全性好及疗效较高等优点, 目前有效率约为 80%. 本文就胃食管反流病的不同治疗方法进行简要评述, 并对内镜下缝合治疗的特点、疗效、方法、适应证、不良反应、禁忌证等问题进行讨论.

杨云生, 令狐恩强. 胃食管反流病的内镜缝合治疗. 世界华人消化杂志 2003;  
11(9):1273-1274

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1273.asp>

## 0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)是指胃或十二指肠内容物反流入食管, 引起并发症或明显的损害了患者的生活质量. 主要表现为烧心、反酸或食物反流, 可引起食管糜烂、溃疡、出血、狭窄等. GERD 非常常见, 西方国家约 10% 的人患有此病, 老年人约 1/4 患有 GERD. 我国该病的发病率具体不详, 京沪二地调查约 6% 的人患有 GERD. GERD 的发病机制尚不完全清楚, 一般认为食管下段括约肌功能障碍或食管运动减弱, 胃肠内容物的化学损伤及食管黏膜防御功能减弱等与其有关. 其治疗主要有药物治疗、外科治疗、腹腔镜下治疗及近来开展的胃镜下治疗. 药物治疗主要依靠抑酸剂和胃肠动力药物, 部分病例反复发作、无法停药或无法控制其症状, 而外科或腹腔镜下治疗也存在许多问题有待解决. 近几年, 胃镜下缝合治疗开始在国内外应用, 目前仅见一篇英文论著报道<sup>[1]</sup>及多篇国外会议摘要报道<sup>[2-6]</sup>. 国内我们首先开展和报道该技术<sup>[7]</sup>, 目前已有 10 家医院陆续应用, 其治疗方法、疗效、适应证、不良反应、禁忌证等问题仍在研究和总结之中. 为了更好的了解和掌握该技术, 我们结合国外报道对以上问题进行总结与阐述.

## 1 胃食管反流病治疗方法及其特点

GERD 的治疗目前主要包括药物治疗、外科治疗、腹腔镜下治疗及近来开展的胃镜下治疗. 药物治疗对于轻中度的 GERD 患者多数可控制症状, 但用药有效, 停药易复发, 且长期服药存在副作用及费用昂贵等问题. 外科治疗多应用于严重的 GERD, 或合并有食管狭窄、Barrett 食管等严重并发症及某些食管裂孔疝的患者; 手术治疗存在创伤大, 效果有时不满意, 且手术效果难以修改等问题. 腹腔镜下治疗 GERD 是一种较外科手术创伤小的“微创”治疗, 适用于部分严重的 GERD, 或合并食管裂孔疝的患者; 该方法也存在一定创伤、效果有时不满意及效果难以修改, 且术后有引起肠功能紊乱、腹腔粘连等并发症的可能. 鉴于上述治疗方法存在许多问题, 探索非药物、创伤小、治疗效果或术后易修改的新方法具有重要意义.

## 2 胃食管反流病内镜下缝合治疗

1994 年英国 Swain et al<sup>[2]</sup>首先将胃镜下缝合治疗应用于人体, 经过数年观察及器械改进, 临床集中开始应用于近 3 a. 我们在国内首先开展该技术, 目前已 1 a. 胃镜下缝合治疗(endoscopic suturing)又称经口腔内折瓣术(transoral endoluminal gastroplication, ELGP)或内镜下胃折叠(endoscopic gastropasty), 目前外文尚无统一名称. 我们在发表的第一篇中文论著中, 经杂志编委会和作者多次讨论应用了胃镜下腔内折叠术<sup>[7]</sup>. 该方法是将美国 BARD 公司生产的缝合器安装在胃镜前端, 于直视下在齿状线附近缝合胃壁组织形成皱褶, 增加贲门口附近紧张度、“延长腹内食管长度”及形成皱褶以阻挡胃肠内容物的反流, 发挥其治疗作用. 目前采用的缝合方式主要有 2 种, 即沿小弯侧进行的纵行缝合和沿贲门四周进行的环行缝合, 另外我们在实践中总结出 2 种方式结合缝合法<sup>[7]</sup>. 如何选择不同的缝合方式报道甚少, 国外一篇论文对纵行缝合和环行缝合进行对照研究, 2 种方式效果无明显差别, 但病例数仅 64 例<sup>[1]</sup>. 我们的体会是食管裂口 2 cm 以下可选择纵行缝合法, 大于 2.5 cm 可采用环行或 2 种方式结合缝合法, 缝合针间距一般为 1.5-2 cm, 二褶间距约 1.5 cm. 手术时间平均 40-60 min, 术后平均 4 h 进流质饮食, 活动无限制, 2 d 后可出院. 该方法的主要优点是经口及食管进行缝合治疗, 无需体表切口, 创伤主要是缝合针孔, 并且术后可在胃镜下修改手术效果或拆除缝线, 是目前治疗 GERD 创伤最小、最方便的一种手术治疗方法.

根据我们的研究及随访GERD的胃镜下缝合治疗约90%的患者于治疗后3 wk内症状基本完全缓解,6 mo以上的随访显示约40%的患者症状完全缓解、另有40%的患者症状部分缓解<sup>[7]</sup>。国外文献数篇论文摘要报道该方法的有效率60-86%<sup>[2-6]</sup>,完全缓解40-60%,部分缓解20-46%,总有效率约为70-80%,与我们的治疗效果大致类似。另有约10-20%的患者症状无缓解,原因不清,可能是食管敏感性改变、缝合方法不当或其他反流机制所致。关于该方法的治疗适应证,目前尚无统一的认识,不同研究小组应用的适应证不尽相同。一般认为烧心或反酸症状出现2 mo以上,3-5次/wk,A-B级(洛杉矶分级)反流性食管炎患者,药物治疗不易控制或用药有效、停药复发,可考虑胃镜下缝合治疗。此外,我们总结的缝合治疗适应证还包括并发有缓解期的哮喘或慢性咽炎,直径2-3.5 cm的食管裂孔疝,部分食管下段狭窄及部分胃食管切除术后胃食管反流病患者<sup>[7]</sup>,这些适应证经临床探索均取得了成功,为GERD及其并发症的治疗开拓了新的指征。

胃镜下缝合治疗常见的不良反应有术中恶心、口腔分泌物增多、缝合处少量渗血,术后咽部轻度疼痛、上腹痛、上腹牵拉感、嗝气等<sup>[7]</sup>。另外,少数病例可出现呼吸困难、缺氧,出血较多,缝合组织撕裂,也有缝合处穿孔的个案报道<sup>[1]</sup>。但一般来讲,该技术是一项安全性较高的治疗方法。关于他的禁忌证,我们认为鼻腔不通畅、感冒、气管狭窄等会影响术中呼吸通气,颈部过短、舌过大、口咽部畸形无法放置套管,以及裂孔疝很大且疝无法复位者,应作为胃镜下缝合治疗禁忌证或相对禁忌证<sup>[7]</sup>,术前应认真进行

研究,严格掌握可行性。

GERD胃镜下缝合治疗是一项新的内镜治疗技术,其器械操作还较复杂,掌握具有一定难度。初学者应先进行动物实验或在有一定经验的医师指导下进行操作。初期常遇到的困难或失败原因有缝合部位不恰当,缝合松紧度及缝合包含组织不适当,缝合的组织撕裂等,这些问题一般在治疗10例次以上后,一次性治疗成功率会明显提高。

鉴于该技术开展时间较短,长期疗效、器械应用、适应证、禁忌证等问题仍需进一步研究总结。

### 3 参考文献

- 1 Filipi CJ, Lehman GA, Rothstein RI, Rajman I, Stiegmann GV, Waring JP, Hunter JG, Gostout CJ, Edmundowicz SA, Dunne DP, Watson PA, Cornet DA. Transoral,flexible endoscopic suturing for treatment of GERD: a multicenter trial. *Gastrointestinal Endoscopy* 2001;53:416-422
- 2 Swain CP. Sewing in the human gastrointestinal tract at flexible endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy* 1994;40:AB84
- 3 Swain CP, Park P-O, Kjellin T. Endoscopic gastroplasty for gastro-esophageal reflux disease (abstract). *Gastrointestinal Endoscopy* 2000;51:AB144
- 4 Pohl H, Wood K, Rothstein R. Endoscopic therapy for gastroesophageal reflux disease: early experience with the Bard endoscopic suturing system and stretta in one institution. *Gastrointestinal Endoscopy* 2001;53:AB126
- 5 Caca K, Schiefke I, Soder H, Neumann S, Zabel-Langhenning A, Mössner J. Endoluminal gastroplication for gastroesophageal reflux disease. *Gastrointestinal Endoscopy* 2002;55:AB2
- 6 Liu JJ, Knapp RM, Carr-Locke DL. The impact of anesthesiologist's experience on endoluminal gastroplication (ELGD). *Gastrointestinal Endoscopy* 2002;55:AB3
- 7 杨云生, 令狐恩强, 孙刚, 王向东, 孟江云, 杜红, 郭荣斌, 王志强, 程留芳, 汪鸿志. 胃镜下腔内折叠术治疗胃食管反流病. *中华消化内镜杂志* 2002;19:265-267



# $\alpha$ -连接素表达与胃癌生物学行为的关系

徐采朴, 周永宁, 陈 渝

徐采朴, 周永宁, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
陈渝, 中国人民解放军第三军医大学西南医院烧伤研究所 重庆市 400038  
徐采朴, 男, 江西省南昌市人, 汉族, 第三军医大学西南医院全军消化专科中心教授, 博士生导师, 专家组成员, 中国胃病专业委员会副会长, 主要从事幽门螺杆菌及胃癌和癌前疾病的研究。  
项目负责人: 徐采朴, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. xcpxx@medmail.com.cn  
电话: 023-68754143  
收稿日期: 2003-03-21 接受日期: 2003-05-17

## Relationship between abnormal expression of $\alpha$ -catenin and biological behaviors of gastric carcinoma

Cai-Pu Xu, Yong-Ning Zhou, Yu Chen

Cai-Pu Xu, Yong-Ning Zhou, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Yu Chen, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Correspondence to: Cai-Pu Xu, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. xcpxx@medmail.com.cn  
Received: 2003-03-21 Accepted: 2003-05-17

## Abstract

**AIM:** To assess the expression of  $\alpha$ -catenin in gastric carcinoma and to determine its relation with tumor clinicopathological features and patient survival.

**METHODS:** Immunohistochemical staining of  $\alpha$ -catenin was performed for 163 cases of gastric carcinomas, 44 cases of gastric dysplasia and 25 cases of intestinal metaplasia, and 28 cases of atrophic gastritis.

**RESULTS:** Normal membranous staining was observed in intestinal metaplasia and control biopsy specimens for  $\alpha$ -catenin. 76 % of tumors and 43 % of gastric dysplasia were stained abnormally for  $\alpha$ -catenin. Only one of atrophic gastritis showed abnormal staining. Abnormal  $\alpha$ -catenin expression occurred more significantly in Borrmann III/IV type than in Borrmann I/II type ( $P < 0.01$ ). A significantly higher proportion of signet-ring (91 %), mucinous (79 %) and tubular adenocarcinomas (78 %) showed abnormal  $\alpha$ -catenin expression compared with papillary adenocarcinomas (47 %) ( $P < 0.01$ ). Moreover, abnormal  $\alpha$ -catenin staining occurred more frequently in diffuse type (95 %, 38/40) than in intestinal type tumors (68 %, 73/108) ( $P < 0.01$ ). No association was found between abnormal  $\alpha$ -catenin and tumour invasive depth, lymph node metastasis and distance metastasis ( $P > 0.05$ , respectively). A survival advantage was not noted in the tumors retaining normal staining of  $\alpha$ -catenin.

**CONCLUSION:** Abnormal expression of  $\alpha$ -catenin occurs frequently in gastric carcinoma, and is closely related to

its poor differentiation. Abnormal expression of  $\alpha$ -catenin in gastric dysplasia may be an early event in tumorigenesis.

Xu CP, Zhou YN, Chen Y. Relationship between abnormal expression of  $\alpha$ -catenin and biological behaviors of gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1275-1278

## 摘要

**目的:** 检测  $\alpha$ -连接素在胃癌及癌前组织的表达, 并分析其与临床病理学及患者生存的关系。

**方法:** 采用免疫组织化学方法检测 163 例胃癌、44 例异型增生、25 例肠化生、28 例萎缩性胃炎石蜡标本的  $\alpha$ -连接素表达水平。

**结果:** 肠化生以及对照组胃黏膜均保留正常的细胞膜染色; 萎缩性胃炎组仅有 1 例异常染色。  $\alpha$ -连接素在胃癌异常表达率为 76 %; 异型增生为 43 %。 Borrmann III 型和 Borrmann IV 型  $\alpha$ -连接素异常表达率显著高于 Borrmann I 型和 Borrmann II 型 ( $P < 0.01$ )。  $\alpha$ -连接素在管状腺癌、黏液腺癌及印戒细胞癌的异常表达率分别为 78 %、79 % 和 91 %, 显著高于乳头状腺癌 (47 %) ( $P < 0.01$ )。  $\alpha$ -连接素在肠型胃癌和弥漫型胃癌的异常表达率分别为 68 % (73/108) 和 95 % (38/40), 二者之间具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。  $\alpha$ -连接素表达与胃癌浸润深度、淋巴结转移和远处转移无关 (分别  $P > 0.05$ )。  $\alpha$ -连接素正常表达患者并未显示生存优势。

**结论:** 胃癌组织广泛存在  $\alpha$ -连接素表达异常, 且异常表达与分化程度差密切相关,  $\alpha$ -连接素表达异常可能是胃癌发生、发展过程中的早期事件。

徐采朴, 周永宁, 陈渝.  $\alpha$ -连接素表达与胃癌生物学行为的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1275-1278  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1275.asp>

## 0 引言

研究证明, 细胞黏附功能下降是恶性肿瘤进展的关键因素。上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)是一类介导同种上皮细胞-细胞间黏附、具有维持组织结构完整性和极性的钙依赖性跨膜蛋白<sup>[1-5]</sup>。E-钙黏蛋白的功能的发挥还需要与其配体-连接素(catenin)结合成复合体<sup>[6-8]</sup>。  $\beta$ -连接素与E-钙黏蛋白直接结合,  $\alpha$ -连接素介导E-钙黏蛋白/ $\beta$ -连接素与细胞骨架的肌动蛋白相连。因此,  $\alpha$ -连接素表达下调可能影响E-钙黏蛋白功能, 并

进而导致细胞黏附下降<sup>[9-11]</sup>。

此前,我们采用免疫组织化学方法对163例胃癌组织E-钙黏蛋白和 $\beta$ -连接素的表达情况及其与临床病理学和生存期的关系进行了研究<sup>[12]</sup>。本项研究中,我们同样采用免疫组织化学方法对上述163例胃癌的 $\alpha$ -连接素( $\alpha$ -Cat)表达进行检测,并分析其与胃癌生物学行为之间的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集1995-01/1997-12胃癌手术标本共163例,男123例,女40例,年龄28-77(平均 $53 \pm 10$ )岁。排除手术后4 wk死亡病例;所有病例术前均未进行任何抗肿瘤治疗。每例均有详细的临床资料和手术记录。113例获得随访,随访时间为6-60 mo。经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋。取胃镜黏膜活检标本85例,其中萎缩性胃炎28例,肠化生25例(其中伴萎缩性胃炎13例),异型增生32例(另手术标本12例,共44例);取健康者胃黏膜12名做正常对照。胃癌分期参照TNM标准;胃癌组织学分类分别依据Lauren和WHO分类法;胃癌大体形态依据Borrmann分类法。异型增生、萎缩性胃炎及肠化生的诊断参照WHO胃组织学分类中心标准和国际胃肠病理学会Padova国际分类标准(1998)<sup>[13]</sup>。

**1.2 方法** 全部标本连续切片,每例6张切片,片厚5  $\mu$ m,1张HE染色,1张进行 $\alpha$ -Cat免疫组织化学染色,其余切片备用。正常胃黏膜组织作为阳性对照,用PBS代替第一抗体作阴性对照,癌旁5-6 cm正常组织作为内对照。免疫组化采用S-P法, $\alpha$ -Cat单克隆抗体和S-P试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。染色方法按S-P试剂盒说明进行。 $\alpha$ -Cat免疫染色阳性物质呈棕褐色(图1)。根据文献将染色半定量计分,0分:细胞膜、质均未染色;1分:细胞质染色为主;2分:细胞膜、质混合染色;3分:正常细胞呈细胞膜染色。同一张肿瘤组织切片,由于分化程度的差异,染色也存在差异,此种情况以主导染色计分;如染色差异超过20%以上,则以混合染色计分。失去细胞膜染色被视为异常,即0-2分为异常染色。

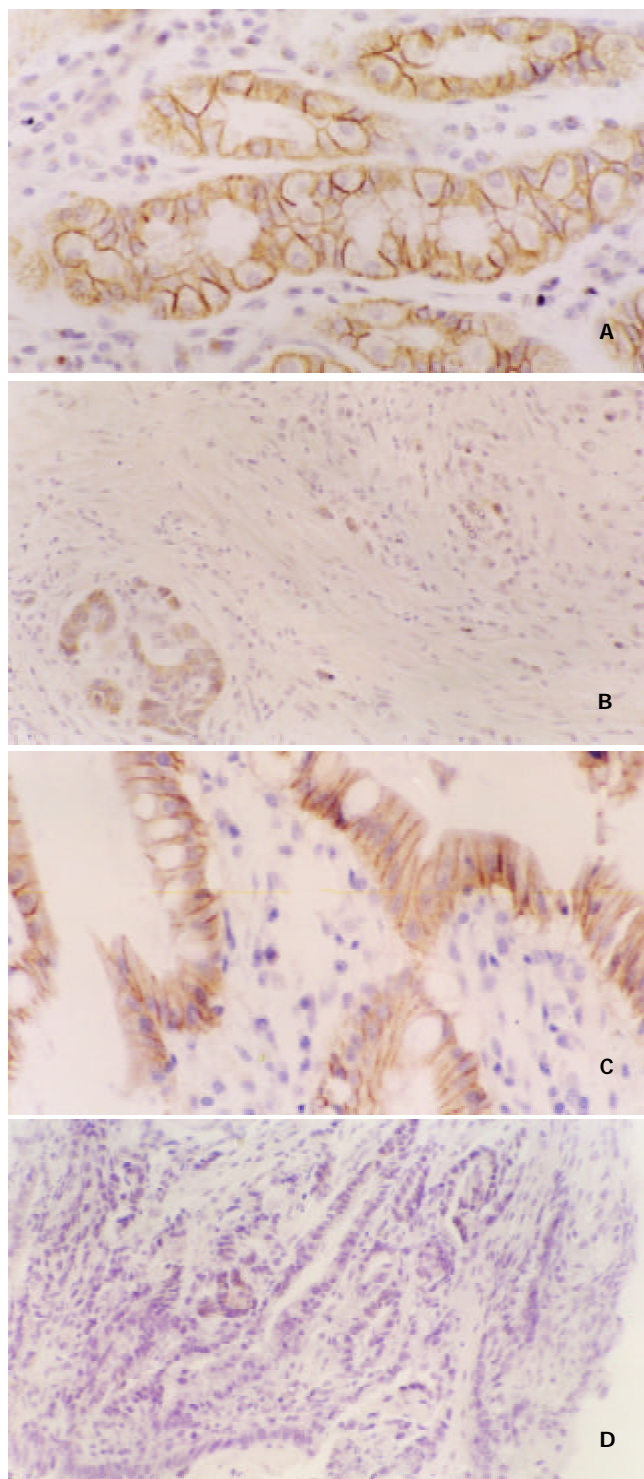
**统计学处理** 采用SPSS 8.0统计分析软件包进行统计学处理。 $\chi^2$ 检验分析 $\alpha$ -Cat的表达与临床病理特征的关系。

## 2 结果

**2.1 胃癌及癌前病变组织 $\alpha$ -Cat表达** 对照组及正常癌旁组织均保留细胞膜阳性染色,细胞-细胞连接处尤为明显。163例胃癌组织中 $\alpha$ -Cat异常表达率为76.1%。44例异型增生中, $\alpha$ -Cat异常表达率为43.2%。萎缩性胃炎仅1例表达异常;肠化生组织 $\alpha$ -Cat均表达正常(图1)。

**2.2  $\alpha$ -Cat表达与胃癌大体形态的关系** 胃癌组织以癌肿最大直径分为小于5 cm、5-10 cm、大于10 cm等三类。 $\alpha$ -Cat在癌肿小于5 cm、5-10 cm及大于10 cm,

其异常表达率分别为50.0%、86.8%和87.2%。结果表明随着癌肿大小的增加, $\alpha$ -Cat的异常表达率亦均显著增高( $P < 0.005$ )。依据Borrmann分型(139例),胃癌大体形态可分为Borrmann I(隆起型)、II(溃疡型)、III(溃疡浸润型)和IV(弥漫浸润型)型。 $\alpha$ -Cat在Borrmann I、II、III及IV型的异常表达率分别为50.0%、85.7%、72.6%和82.1%, $\alpha$ -Cat在Borrmann I及II和III及IV型之间,其异常表达率无显著差异。



A 正常细胞膜染色( $\times 400$ )。B 低分化腺癌保留腺管处细胞染色,并可见核染,余未着色( $\times 200$ )。C 中度肠化细胞膜正常染色( $\times 400$ )。D 中-重度异型增生细胞未染色( $\times 200$ )。  
图1  $\alpha$ -catenin的表达(SP)。



2.3  $\alpha$ -Cat 表达与胃癌组织学的关系 癌细胞局限于肌层内(T<sub>1</sub>/T<sub>2</sub>期)与癌细胞已浸润至质膜或质膜以外(T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>期)的胃癌之间,  $\alpha$ -Cat 异常表达率无显著性差异( $P > 0.05$ ). 163例胃癌, 淋巴结转移92例, 转移率56.4%, 结果显示,  $\alpha$ -Cat 的异常表达与淋巴结转移与否之间无显著差异( $P > 0.05$ ). 本组胃癌远处转移34例(肝脏转移3例、胰腺转移2例、腹腔种植7例、3组淋巴结转移22例), 转移率20.1%, 结果表明, 胃癌发生远处转移与否, 其 $\alpha$ -Cat 异常表达之间无显著性差异( $P > 0.05$ ). 依据WHO分类,  $\alpha$ -Cat在管状腺癌、黏液腺癌及印戒细胞癌的异常表达率分别为78.0%, 79.2%和90.0%, 高于乳头状腺癌(46.7%), 具有显著性差异( $P < 0.01$ ), 未分化癌因例数少(3例), 未统计处理. 根据Lauren分型, 胃癌组织学可分为肠型(分化好)、弥漫型(分化差)和混合型. 结果表明, 弥漫型 $\alpha$ -Cat异常表达率显著高于肠型( $P < 0.01$ 表1).

表1  $\alpha$ -Cat 表达与胃癌组织学的关系

肿瘤病理	n	$\alpha$ -Cat 表达 N(%)	
		正常	异常
T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>	65	16 (36.9)	49 (63.1)
T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	98	23 (23.5)	75 (76.5)
淋巴结转移 N <sub>0</sub>	71	20 (28.2)	51 (71.8)
N <sub>1</sub> /N <sub>2</sub>	92	19 (20.7)	73 (79.3)
远处转移 M <sub>0</sub>	129	33 (25.6)	96 (74.4)
M <sub>1</sub>	34	6 (17.6)	28 (82.4)
乳头状腺癌	16	9 (53.3)	7 (46.7) <sup>a</sup>
管状腺癌	109	24 (22.0)	85 (78.0)
黏液腺癌	24	5 (20.8)	19 (79.2)
印戒细胞癌	11	1 (9.1)	10 (90.9)
未分化癌	3	0	3 (100)
肠型	108	35 (32.4)	73 (67.6) <sup>b</sup>
弥漫型	40	2 (5.0)	38 (95.0)
混合型	15	2 (13.3)	13 (86.7)

<sup>b</sup> $P < 0.01$ 

2.4  $\alpha$ -Cat 表达与生存时间的关系 本组163例胃癌中, 1例术后12d死亡, 49例失访, 最后随访病例113例. 应用Kaplan-Meier曲线及Cox多元回归分析分析显示: 患者半数生存期为1067(78-2365)d;  $\alpha$ -Cat异常表达患者其平均生存时间为(1378 ± 110)d, 正常表达者则为(1117 ± 143),  $\alpha$ -Cat表达与患者生存时间无相关关系( $P = 0.914$ ).

### 3 讨论

已发现E-钙黏蛋白-连接素复合体在人类众多恶性肿瘤中表达异常. 国内外研究<sup>[14-17]</sup>显示E-钙黏蛋白-连接素复合体在胃癌的异常表达率为20-90%. 此前, 我们<sup>[12]</sup>采用免疫组化对163例胃癌组织检测显示, E-钙黏蛋白及 $\beta$ -连接素异常表达率分别为46%和48%, 本项研究采用同样方法发现163例胃癌中 $\alpha$ -Cat异常表达率为74%, 以上结果表明胃癌广泛存在E-钙黏蛋白-连接素复合体表达异常. 我们亦发现胃癌 $\alpha$ -Cat表达异常比E-钙黏蛋白和 $\beta$ -连接素频繁( $\chi^2 = 35.1$ ,  $P < 0.01$ ), 表明在细胞恶性转化过程中,  $\alpha$ -Cat更易于表达下调<sup>[18]</sup>. 对97例胃癌癌前组织的检测发现44例异型增生中, 19例(43%) $\alpha$ -Cat表达异常, 表明 $\alpha$ -连接素表达下调可能是胃癌发生、发展过程中的早期事件<sup>[19, 20]</sup>. 我们发现 $\alpha$ -Cat表达与胃癌细胞分化程度密切相关, 低分化腺癌 $\alpha$ -Cat的异常表达率显著高于高/中分化腺癌( $P < 0.01$ ), 表明 $\alpha$ -Cat在细胞分化机制中可能发挥某种重要作用, 可作为胃癌分化指标. 但 $\alpha$ -Cat与浸润深度、淋巴结转移及远处转移无相关关系.

浸润和转移是癌症患者致死的首要原因. E-钙黏蛋白介导的黏附系统已被公认为“浸润抑制系统”, 且E-钙黏蛋白基因已被公认为抑癌基因<sup>[14, 21-23]</sup>. 当E-钙黏蛋白表达下调或功能障碍, 将使同种细胞失去黏附; 而对于上皮性肿瘤, 则意味肿瘤细胞具备侵袭性生长的特点, 并容易从原发灶脱落分离, 向局部淋巴结转移或远处转移. E-钙黏蛋白黏附功能的发挥, 还要受其配体-Cat调节. Cat是与E-钙黏蛋白关系最为密切的细胞质黏附相关蛋白, 在胞质内 $\beta$ -连接素直接与E-钙黏蛋白胞质区的细胞内肽段结合,  $\alpha$ -Cat则将 $\beta$ -连接素与细胞骨架的肌动蛋白微丝相连, 共同形成E-钙黏蛋白-连接素复合体, 使E-钙黏蛋白集中定位于细胞与细胞间的接触部位, 从而介导同种细胞的连接和维持细胞的极性. 因此,  $\alpha$ -Cat具有调节E-钙黏蛋白功能的作用, 其表达下调将影响E-钙黏蛋白介导的细胞-细胞黏附活性, 尽管此时E-钙黏蛋白和 $\beta$ -连接素表达正常<sup>[19, 24]</sup>. 体外实验<sup>[25]</sup>证实, 缺失 $\alpha$ -Cat的PC9肺癌细胞株, 尽管E-钙黏蛋白表达正常, 但细胞-细胞间黏附丧失; 而当转染 $\alpha$ -Cat基因后, 细胞黏附功能恢复. 我们发现胃癌 $\alpha$ -Cat表达异常(73.6%)比E-钙黏蛋白(44.6%)<sup>[12]</sup>更为频繁, 表明那些E-钙黏蛋白表达正常的胃癌细胞, 由于 $\alpha$ -Cat失去表达或表达下调, 导致细胞-细胞间黏附下降, 从而发生浸润和转移<sup>[26-28]</sup>. 此外,  $\beta$ -连接素异常生化修饰如酪氨酸磷酸化可破坏E-钙黏蛋白与 $\alpha$ -连接素的连接, 也可影响E-钙黏蛋白介导的细胞黏附功能<sup>[29]</sup>.

我们对获得随访的113例应用Kaplan-Meier曲线和Cox多元回归方法进行分析, 发现 $\alpha$ -Cat正常表达与异常表达患者之间比较并无生存优势( $P = 0.914$ ), 表明 $\alpha$ -Cat表达与患者生存无相关关系.

### 4 参考文献

- 1 Zhou YN, Wu ZD, Xu CP, Fang DC. E-cadherin complex in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:436-440
- 2 Zheng ZH, Sun XJ, Qiu GR, Liu YH, Wang MX, Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition, early and advanced stage of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*

- 2002;10:153-156
- 3 Becker KF, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G, Schuhmacher C, Muller W, Gabbert HE, Ochiai A, Hirohashi S, Hofler H. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1999;155:1803-1809
- 4 Cai J, Ikeguchi M, Tsujitani S, Maeta M, Liu J, Kaibara N. Significant correlation between micrometastasis in the lymph nodes and reduced expression of E-cadherin in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2001;4:66-74
- 5 Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001;3:289-293
- 6 Bair EL, Massey CP, Tran NL, Borchers AH, Heimark RL, Cress AE, Bowden GT. Integrin and cadherin-mediated induction of the matrix metalloprotease matrilysin in cocultures of malignant oral squamous cell carcinoma cells and dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 2001;270:259-267
- 7 Katoh M. Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001;19:1003-1007
- 8 Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, Yuen ST, Law SY, Hui WM, Lai KC, Wong CY, Hu HC, Lai CL, Wong J. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 2001;48:808-811
- 9 Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, Go MY, Chung SC, Sung JJ. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001;91:2294-2301
- 10 Ramesh S, Nash J, McCulloch PG. Reduction in membranous expression of beta-catenin and increased cytoplasmic E-cadherin expression predict poor survival in gastric cancer. *Br J Cancer* 1999;81:1392-1397
- 11 Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:569-573
- 12 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 13 Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H. Gastric dysplasia. The padove international classification. *Am J Surg Pathol* 2000;124:167-176
- 14 Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001;77: 201-207
- 15 Joo YE, Rew JS, Kim HS, Choi SH, Park CS, Kim SJ. Changes in the E-cadherin-catenin complex expression in early and advanced gastric cancers. *Digestion* 2001;64:111-119
- 16 Ohene-Abuakwa Y, Noda M, Perenyi M, Kobayashi N, Kashima K, Hattori T, Pignatelli M. Expression of the E-cadherin/catenin (alpha-, beta-, and gamma-) complex correlates with the macroscopic appearance of early gastric cancer. *J Pathol* 2000;192:433-439
- 17 Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:207-216
- 18 Shiozaki H, Iihara K, Oka H, Kadowaki T, Matsui S, Gofuku J, Inoue M, Nagafuchi A, Tsukita S, Mori T. Immunohistochemical detection of  $\alpha$ -catenin expression in human cancers. *Am J Pathol* 1994;144:667-674
- 19 Yu J, Ebert MP, Miehlke S, Rost H, Lendeckel U, Leodolter A, Stolte M, Bayerdorffer E, Malfertheiner P. alpha-catenin expression is decreased in human gastric cancers and in the gastric mucosa of first degree relatives. *Gut* 2000;46:639-644
- 20 Zhou YN, Xu CP, Han B, Wang JS, Fang DC, Peng GY, Yang JM, Liu HF. E-cadherin expression correlates with clinicopathological features in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:1121-1124
- 21 Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361
- 22 Fukudome Y, Yanagihara K, Takeichi M, Ito F, Shibamoto S. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2000;88:579-583
- 23 Xiangming C, Hokita S, Natsugoe S, Tanabe G, Baba M, Takao S, Kuroshima K, Aikou T. Cooccurrence of reduced expression of alpha-catenin and overexpression of p53 is a predictor of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Oncology* 1999;57:131-137
- 24 Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol* 1994;127:247-256
- 25 Shun CT, Wu MS, Lin MT, Chang MC, Lin JT, Chuang SM. Immunohistochemical evaluation of cadherin and catenin expression in early gastric carcinomas: correlation with clinicopathologic characteristics and *Helicobacter pylori* infection. *Oncology* 2001;60:339-345
- 26 Li Y, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin,  $\alpha$ -catenin and biological behaviors of human pancreatic cancer. *Zhonghua Xiaohua Zazhi* 2002;22:150-152
- 27 Dai TQ, Chen JQ, Xu HM. The clinical significance of E-cadherin and alpha-catenin expression in human gastric cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:35-38
- 28 Tanaka M, Kitajima Y, Edakuni G, Sato S, Miyazaki K. Abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin may be a molecular marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early gastric cancer. *Br J Surg* 2002;89:236-244
- 29 Katoh M. Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer. *Int J Oncol* 2001;19:1003-1007



# 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访

王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李 晖, 姚 晨, 吴本俨, 尤纬缔

王孟薇, 杨少波, 张子其, 王刚石, 吴本俨, 尤纬缔, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853  
祝庆孚, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853  
李晖, 姚晨, 中国人民解放军总医院医学统计教研室 北京市 100853  
王孟薇, 女, 汉族, 1932-03 出生于浙江省杭州市。1956 年毕业于第一军医大学(现白求恩医科大学)现为解放军总医院专家组成员, 南楼消化科教授主任、医师博士生导师, 中华医学会老年学会消化病学组组长 1992 年起享受政府特殊津贴长期从事消化系统肿瘤的基础和临床研究, 发表论文 100 篇。  
全军“十五”医学科研基金重点课题资助项目, No.01Z035  
项目负责人: 王孟薇, 100853, 北京市, 中国人民解放军总医院南楼消化科。  
电话: 010-66939333  
收稿日期: 2002-11-12 接受日期: 2002-11-28

## Gastrosocopy follow-up study of pre-malignant gastric lesions in senile patients

Meng-Wei Wang, Shao-Bo Yang, Zi-Qi Zhang, Qing-Fu Zhu, Gang-Shi Wang, Hui Li, Cheng Yao, Ben-Yan Wu, Wei-Di You

Meng-Wei Wang, Shao-Bo Yang, Zi-Qi Zhang, Gang-Shi Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Department of Geriatric Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China  
Qing-Fu Zhu, Department of Pathology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China  
Hui Li, Cheng Yao, Department of Medical Statistics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China  
Supported by the Key Project Grant in Medical Sciences during the Tenth Five-Year Plan of Chinese PLA, No. 01Z035  
Correspondence to: Meng-Wei Wang, Department of Geriatric Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China.  
Received: 2002-11-12 Accepted: 2002-11-28

## Abstract

AIM: To discover the incidence of gastric cancer in pre-malignant gastric lesions and to evaluate the importance of gastroscopy follow-up for gastric cancer at an early stage.

METHODS: A total of 1 417 patients received endoscopy. Among them, 750 patients who agreed to undergo annual surveillance endoscopy were studied.

RESULTS: Among the 1 417 patients who received endoscopy, 64 had gastric cancer (4.5 %). 35.9 % of them were at their early stage. 82 cancers were detected (10.9 %) during the follow up period. 62 % of them were at their early stage (62.2 % vs 35.9 %;  $P < 0.005$ ). Gastric dysplasia was frequent in gastric cancers than in non-cancer group (37.0 % vs 13.1 %;  $P < 0.01$ ). Intestinal metaplasia was also more frequent in gastric cancer group than in non-cancer group (67.1 % vs 58.1 %;  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: In patients with intestinal metaplasia or dysplasia, endoscopic surveillance can detect most new tumors at an early stage.

Wang MW, Yang SB, Zhang ZQ, Zhu QF, Wang GS, Li H, Yao C, Wu BY, You WD. Gastrosocopy follow-up study of premalignant gastric lesions in senile patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1279-1281

## 摘要

目的: 研究胃癌前黏膜变化发展演变的规律, 以及胃镜检查随访对胃癌早期发现的意义。

方法: 对 1 417 例患者进行胃镜检查, 其中对 750 例进行了胃镜随访检查。

结果: 在 1417 例中首次胃镜检查即诊断为胃癌者 64 例, 发现率 4.5%; 在以后随访检查中又先后发现胃癌 82 例 (10.9 %), 随访中检出的胃癌中早癌占 62.2 % (51/82), 显著高于首次检出胃癌的早癌率 35.9 % (23/64)。胃癌组的异型增生检出率 (37.0 %) 显著高于非癌组 (13.1 %), 同样随访发现的胃癌的累积肠上皮化生率 (67.1 %) 显著高于非癌组 (58.1 %)。

结论: 对胃黏膜异型增生和肠上皮化生等病变的检查随访有利于胃癌 (尤其是早期胃癌) 的发现。

王孟薇, 杨少波, 张子其, 祝庆孚, 王刚石, 李晖, 姚晨, 吴本俨, 尤纬缔. 老年人胃癌前黏膜癌变的胃镜随访. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1279-1281  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1279.asp>

## 0 引言

胃癌处于我国各种恶性肿瘤死亡率的首位, 老年人面临罹患胃癌的巨大威胁<sup>[1-10]</sup>. 早诊早治是目前提高胃癌存活率的惟一有效措施<sup>[11-14]</sup>. 我们分析近 20 a 老年人群的胃镜检查、黏膜病理组织学变化及随访资料, 最长随访时间为 11 a, 以探讨胃癌癌前变化的演变规律及胃镜检查随访对老年人胃癌早期诊断的意义。

## 1 材料和方法

1973/1997 年资料完整胃镜检查老年人 (大于 60 岁) 1 417 例, 进行黏膜病理检查及随访研究, 患者数月或数年行胃镜检查 1 次, 每次均取胃黏膜行病理检查, 由 2 名以上有经验的病理医师进行病理诊断, 对肠上皮化生和异型增生均分轻中重三度, 对萎缩性胃炎则不分程度, 对胃癌定位、分期及组织类型均作出判断。1 417 例中活检部位: 胃窦 895 例 (63.2 %), 胃体部 326 例 (23 %), 胃底部 105 例 (7.4 %), 贲门部 91 例 (6.4 %). 1 417 例中检出胃癌者列为胃癌组, 共 146 例 (10.3 %), 未检出胃癌者列为非癌组, 共 1 271 例 (89.7 %). 1417 例中仅做 1 次检查者 667 例, 行 2 次及以上检查者 750 例 (共 2 529 例), 共行胃镜检查 3 196 例, 其中胃癌组 363 例 (11.4 %), 非癌组 2 833 例 (88.6 %).

统计学处理 计数资料用  $\chi^2$  检验或 Ridit 分析。

## 2 结果

**2.1 胃癌的检出** 在1417例中首次胃镜检查即诊断为胃癌者64例,发现率为4.5%,在以后随访检查中又先后发现胃癌82例,共发现胃癌146例,累计胃癌发现率为10.3% (146/1417),其中随访检查发现者占所有胃癌的56.2% (82/146)胃窦69例(47.3%),胃体36例(24.6%),贲门部33例(22.6%),胃底部8例(5.5%)单纯腺癌126例(86.3%),印戒细胞癌10例(6.8%),混合癌(腺癌+印戒细胞癌)10例(6.8%)早期74例(50.7%),进展期72例(49.3%)随访中检出的胃癌中早癌占62.2% (51/82),显著高于首次检出胃癌的早癌率35.9% (23/64),  $\chi^2=9.915$ ,  $P<0.005$  贲门部的早癌率27.3% (9/33),显著低于其他部位的早癌率57.5% (65/113),  $\chi^2=8.3448$ ,  $P<0.005$  有萎缩性胃炎背景者早癌率为74.0% (37/50),显著高于无萎缩性胃炎者早癌率43.8% (14/32),  $\chi^2=7.5937$ ,  $P<0.005$ ;有异型增生者其早癌率为84.8% (37/46),显著高于缺乏异型增生环节者早癌率33.3% (12/36),  $\chi^2=22.7553$ ,  $P<0.001$  在146例胃癌中腺癌、印戒细胞癌和混合癌的累积萎缩性胃炎检出率分别为48.4% 20.0%和10.0%,腺癌高于另两类癌,  $\chi^2=7.826$ ,  $P<0.01$ ;累积肠上皮化生检出率分别为46.6% 10.0%和40.0%,差异无显著意义;累积异型增生检出率为41.3%, 20.0%和0,腺癌较高,  $\chi^2=8.1$ ,  $P<0.05$ .

**2.2 萎缩性胃炎与胃癌发生率** 在1417例首检发现萎缩性胃炎552例,发现率为41.6%,在以后检查中又发现萎缩性胃炎282例,共834例,累积萎缩性胃炎率58.9%随访发现的胃癌的累积萎缩性胃炎率为61.0% (50/82),非癌组的累积萎缩性胃炎率为60.6%,二者并无差别.其中只有胃底部的胃癌组萎缩性胃炎率(75.0%)高于非癌组(27.8%),  $\chi^2=5.596$ ,  $P<0.05$ .

**2.3 肠上皮化生与胃癌发生率** 在1417例首次肠上皮化生检出率为43.4% (615/1417),在以后检查中又发现肠上皮化生184例,共799例,累积肠上皮化生发现率为56.4%随访发现的胃癌的累积肠上皮化生率为67.1%,高于非癌组(58.1%),两组中的中重度肠上皮化生比例胃癌组(56.7%)高于非癌组(8.8%),  $\chi^2=117.15$ ,  $P<0.001$ ,而且各部位均如此,非癌组无1例重度肠上皮化生.

**2.4 异型增生与胃癌发生率** 在1417例首次检出异型增生101例,占7.1%,胃癌组16.4%,非癌组6.1%,  $\chi^2=21.315$ ,  $P<0.01$ ,在以后的检查中又陆续发现异型增生120例,共221例,累计异型增生检出率15.6%,其中胃癌组37.0%,非癌组13.1%,  $\chi^2=56.581$ ,  $P<0.01$ .以异型增生的程度(轻,中,重)作Ridit分析,胃癌组无论首次或累积程度分布均重于非癌组,累积分布 $R\pm S_R$ 分别为 $0.6211\pm 0.0217$ 和 $0.4861\pm 0.0046$ ,  $P<0.01$ .146例胃癌中共有异型增生54例,其中中重度43例,占79.63%,而非癌组167例异型增生中,中重度43例,只占28.74%,差异有极显著意义,  $\chi^2=43.627$ ,  $P<0.01$ .

## 3 讨论

近年来胃癌的早期诊断研究仍无突破性进展<sup>[11-14]</sup>本研究显示准确胃镜检查并病理活检以及随访是目前发现早期胃癌切实可行的最重要的手段,我们应用此方法发现的老年人胃癌的早癌率达50.68%.其中贲门部的早期胃癌率显著低于其他部位胃癌,除了贲门癌本身有不同于其他部位胃癌的生物学特征外<sup>[15]</sup>,对贲门部病变研究较少这也可能是其早癌率低的一个因素,临床上应注意此部位的病变.本组中随访发现的胃癌其早癌率显著高于首次胃镜检查即发现者,说明在老年人群中进行上述方式的动态观察对胃癌早期诊断有重要意义.

胃癌的病因尚未阐明,一般认为是多因素作用和多阶段的过程.肠型胃癌的演变规律为:正常胃黏膜→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→胃癌(肠型),我们发现萎缩性胃炎、肠上皮化生和异型增生的胃癌其早癌率明显高,尤其是有异型增生者的早癌率明显高于无异型增生者,说明医务人员和患者对这些病变警惕性高,同时显示对癌前疾病(萎缩性胃炎)和癌前病变(肠上皮化生和异型增生)的跟踪随访,有利于老年人胃癌的早期诊断弥漫型胃癌的组织发生与肠型胃癌有所不同,其癌旁多为胃固有黏膜,萎缩性胃炎病变轻,肠上皮化生发生率低.有人提出胃印戒细胞癌可能有不同的组织发生过程,其常伴有一种特殊的异型增生性化生(球样异型增生).我们发现一些胃癌并不经历萎缩性胃炎.肠上皮化生和异型增生这些阶段,而且这些胃癌的早癌率明显低.含印戒细胞成分的胃癌(印戒细胞型和混合型)较少出现萎缩性胃炎和异型增生等变化.以上说明我们若只对癌前病变的老年人进行胃镜随访,势必使一部分胃癌失去早期诊断的机会,对弥漫型胃癌等的癌前变化需要进一步认识.

癌前期变化可分为癌前病变和癌前状态(疾病),胃癌的癌前病变包括肠上皮化生和异型增生,老年人胃癌癌前疾病主要是萎缩性胃炎,胃息肉和残胃等,我们发现胃癌组萎缩性胃炎累积发现率与非胃癌组相似,故老年萎缩性胃炎不宜统称为癌前疾病,胃底部萎缩性胃炎率胃癌组较非癌组高,胃底发现萎缩性胃炎可能有较大的意义.我们发现胃癌组累积肠上皮化生率高于非癌组,两组中中重度肠上皮化生比例是胃癌组显著高于非癌组.对于肠上皮化生是否为胃癌前病变一直有争议,本研究显示肠上皮化生是老年胃疾患中常见的病变,把所有的肠上皮化生视为癌前病变显然是不合适的,轻度肠上皮化生不应视为癌前病变,而中重度肠上皮化生(尤其是重度)在胃癌发生中可能有意义,非癌组中无1例重度肠上皮化生.

异型增生是目前公认的胃癌癌前病变,尤其是中重度异型增生<sup>[16]</sup>,有研究表明按三级分类诊断为轻度异型增生的病例,多数是慢性胃炎的反应性上皮增生,而非肿瘤性增生<sup>[17]</sup>,本组发现胃癌组的异型增生累积检出率和程度均高于非癌组,结果支持上述观点.我们



还发现非癌组也有较高的中重度异型增生率, 有的病例发现重度异型增生后随访最长达 6 a 未发现癌, 其异型增生减轻或消失, 提示即便是重度异型增生仍可以逆转, 或是这些重度异型增生为“点状”病变, 再活检时未能发现。研究发现胃癌的癌前病变中的增生细胞核抗原标记指数显著高于非胃癌患者的癌前病变<sup>[18]</sup>, 说明不同的癌前病变有不同的转归, 如何进行区分是一个重要课题。

目前惯用的“癌前病变”和“癌前疾病”的概念和标准均较模糊, 患者、临床医师、病理医师和科研人员对此均存在困惑, 所谓“癌前”理论上基本会发展成为癌的情况, 本研究显示“萎缩性胃炎”、“肠上皮化生”和“异型增生”等均未达到这一要求, 有必要更新癌前变化的概念, 提出新的指标, 近年分子生物学研究表明, 在胃癌癌变过程中有多种癌基因和抗癌基因发生结构和表达异常<sup>[19-30]</sup>, 寻找特异的胃癌相关基因或许会提供这种可能。当然, 目前对老年人“萎缩性胃炎”、“肠上皮化生”和“异型增生”等进行跟踪随访对胃癌的早期诊断仍具有相当大的现实意义, 但仅随访这些癌前变化, 不会利于发现弥漫型胃癌, 这是跟踪胃癌癌前病变的一个局限, 应当重视。

#### 4 参考文献

- Zhang FX, Deng ZY, Zhang XY, Kang SC, Wang Y, Yu XL, Wang H, Bian XH. Telomeric length associated with prognosis in human primary and metastatic gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:153-155
- Cui DX, Yan XJ, Zhang L, Zhao JR, Jiang M, Guo YH, Zhang LX, Bai XP, Su CZ. Screening and its clinical significance of 6 fragments of highly expressing genes in gastric cancer and precancerous mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:770-772
- Wang CD, Chen YL, Wu T, Liu YR. Association between low expression of somatostatin receptor II gene and lymphoid metastasis in patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:864-866
- Wang Q, Jin PH, Lin GW, Xu SR. Cost-effectiveness of population-based *Helicobacter pylori* screening to prevent gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:262-265
- Cheng SD, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Guo QS. Abnormal drug accumulation in multidrug resistant gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:131-134
- Gao MX, Zhang NZ, Ji CX. Estrogen receptor and PCNA in gastric carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1117-1120
- Gao P, Jiang XW, Yuan WJ. Effects of gastrin and gastrin receptor antagonist proglumide on gastric cancer line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:22-24
- Wu HP, Wu KC, Li L, Yao LP, Lan M, Wang X, Fan DM. Cloning of human cyclooxygenase-2 (COX-2) encoding gene and study of gastric cancer cell transfected with its antisense vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1211-1217
- Zheng ZH, Sun XJ, Qiu GR, Liu YH, Wang MX, Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition. early and advanced stages of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:153-156
- 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 乔友林, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠. 中国 1990 - 1992 年胃癌死亡调查分析. *中华肿瘤杂志* 2002;24:4-8
- 王孟薇. 老年人胃癌癌前病变的确定与跟踪. *中华老年医学杂志* 1997;16:121-123
- 吴云林, 陈颖. 早期胃癌的临床筛选研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1372-1375
- 徐采朴. 应重视早期胃癌的内镜诊断. *世界华人消化杂志* 2002;10:373-375
- 王希明, 周宏远. 萎缩性胃炎内镜检查及随访 229 例. *世界华人消化杂志* 2002;10:1081-1082
- 周琦, 王立东. 贲门癌的生物特征. *华人消化杂志* 1998;6:636-637
- 金行藻. 胃黏膜活检中癌和异型增生的诊断. *临床和实验病理学杂志* 1999;15:254-254
- 王鲁平, 赵立妹, 丁华野, 田玉旺, 胡海, 邢惠清. 胃上皮异型增生 107 例临床病理学观察. *诊断病理学杂志* 2001;8:199-201
- 伍银桥, 王孟薇, 尤经纬, 祝庆孚. 胃癌前病变不同转归中 p53、bcl-2 基因的表达以及细胞增生活性的研究. *中华老年医学杂志* 2000;19:347-349
- Zhou LY, Chen CY, Liang P, Chen LY. ICAM-1 and VCAM-1 expressions on benign gastric mucosa and gastric adenocarcinoma associated with *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:279-281
- Guo CQ, Wang YP, Liou GY, Ma SW, Ding GY, Li JC. Study on *Helicobacter pylori* infection and p53, c-erbB-2 gene expression in carcinogenesis of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:313-315
- Wang DX, Fang DC, Liu WW. Study on alteration of multiple genes in intestinal metaplasia, atypical hyperplasia and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:855-859
- Wang RQ, Fang DC, Liu WW. MUC2 gene expression in gastric cancer and preneoplastic lesion tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:285-288
- Wang GS, Wang MW, Wu BY, You WD, Yang XY. A novel gene, GCRG244, is differentially expressed in human gastric mucosa. *World J Gastroenterol* 2003;9:30-34
- 郝冬梅, 孙秀菊, 郑志红, 贺光, 马鸣超, 徐惠绵, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前病变相关基因的筛查及表达研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:6-9
- 房殿春. 基因不稳在胃癌发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:1-5
- 徐俊荣, 崔大祥, 张 沥, 张玲霞, 贾长河, 张宁霞, 江梅, 曹广周. 基因芯片法筛选萎缩性胃炎相关的差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:47-50
- 孙秀菊, 孙开来, 付浩, 王舒宝, 陈峻青. 胃癌细胞 nm23H1 基因表达与体内外侵袭力的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11:10-13
- 贾长河, 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 江梅, 张宁霞, 曹广周. 热盐水所致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜 HSP 及 p53 蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:29-32
- 周永宁, 徐采朴, 房殿春. CpG 岛甲基化与胃肠道肿瘤. *世界华人消化杂志* 2003;11:65-71
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中 bax 蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:22-24

# 内皮抑素 - 血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗

潘 欣, 李 喆, 张 珉, 王 泳, 潘 卫, 戚中田

潘欣, 张珉, 潘卫, 戚中田, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室 上海市 200433  
李喆, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院普通外科 上海市 200433  
王泳, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院眼科 上海市 200433  
潘欣, 女, 1968-10-25 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 1991 年湖南师范大学本科毕业, 1994 年湖南师范大学硕士研究生毕业, 2000 年第二军医大学博士研究生毕业, 副教授, 主要从事肿瘤基因治疗研究.  
国家自然科学基金资助课题, No. 39970819  
项目负责人: 潘欣, 200433, 上海市翔殷路 800 号, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室. panxinxp@yahoo.com  
电话: 021-25070314 传真: 021-25070312  
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-22

## Therapeutic effect of endostatin-vascular endothelial growth inhibitor recombinant adenoviruses on gastric carcinoma in nude mice

Xin Pan, Zhe Li, Min Zhang, Yong Wang, Wei Pan, Zhong-Tian Qi

Xin Pan, Min Zhang, Wei Pan, Zhong-Tian Qi, Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Zhe Li, Department of Surgery, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Yong Wang, Department of Ophthalmology, Affiliated Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39970819.  
Correspondence to: Dr. Xin Pan, Department of Microbiology, Second Military Medical University, 800 Xiangyin Road, Shanghai 200433, China. panxinxp@yahoo.com  
Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-22

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of recombinant adenoviruses carrying the endostatin-VEGI<sub>151</sub> fusion gene Alerapy on gastric carcinoma in nude mice.

**METHODS:** Human gastric carcinoma SGC7901 cells ( $5 \times 10^6$ ) were injected sc into the dorsal midline of nude mice (3 weeks old), and 500  $\mu$ L ( $10^{12}$  TCID<sub>50</sub>/L) of recombinant adenoviruses AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> or AdLacZ was given respectively sc every other day for ten times. Twenty-four hours after the last injection, tumor size, inhibition rate, expression of target gene, proliferating cell nuclear antigen label index (PCNA LI), apoptotic index (AI), and intratumoral microvessel density (MVD) were evaluated respectively after the mice were sacrificed.

**RESULTS:** Compared with the control group AdLacZ ( $2.356 \pm 1.140$  mm<sup>3</sup>), the average tumor size of group AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> was reduced in size ( $328 \pm 156$  mm<sup>3</sup>,  $F = 12.42$ ,  $P = 0.0125$ ) with an inhibition rate of 86.1 %. The adenoviruses carrying the target gene could be expressed in gastric carcinoma. The PCNA LI of the treated mice ( $0.13 \pm 0.09$  %)

was lower than the control ( $1.40 \pm 0.53$  %,  $F = 22.30$ ,  $P = 0.0033$ ). The AI was higher in the treated mice ( $5.09 \pm 0.25$  %) than in the control ( $0.61 \pm 0.67$  %,  $F = 155.13$ ,  $P = 0.0001$ ). The MVD was lower in the treated mice ( $0.06 \pm 0.03$  %) than in the control ( $1.09 \pm 0.76$  %,  $F = 7.38$ ,  $P = 0.0348$ ).

**CONCLUSION:** The recombinant adenovirus carrying fusion gene of hENDO-VEGI<sub>151</sub> can express the fuion protein in gastric carcinoma in nude mice and inhibit the tumor growth.

Pan X, Li Z, Zhang M, Wang Y, Pan W, Qi ZT. Therapeutic effect of endostatin-vascular endothelial growth inhibitor recombinant adenoviruses on gastric carcinoma in nude mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1282-1285

## 摘要

**目的:** 研究重组腺病毒携带hENDO-VEGI<sub>151</sub>融合基因治疗胃癌的可行性.

**方法:** 分别用 500  $\mu$ L 滴度为  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub>/L 的粗制重组腺病毒AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub>或AdLacZ皮下注射治疗荷胃癌裸鼠, 隔天 1 次, 共注射 10 次. 最后一次注射 24 h 后处死动物, 检测肿瘤体积、抑瘤率、目的基因的表达、增生细胞核抗原指数(PCNA LI)、肿瘤细胞凋亡指数(AI)、肿瘤微血管密度(MVD).

**结果:** 注射AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub>的治疗组肿瘤体积为  $328 \pm 156$  mm<sup>3</sup>, 注射 AdLacZ 的对照组肿瘤体积为  $2.356 \pm 1.140$  mm<sup>3</sup>, 差异显著( $F = 12.42$ ,  $P = 0.0125$ ), 抑瘤率为 86.1 %; 重组腺病毒携带的目的基因均能在荷胃癌裸鼠肿瘤组织中表达; 治疗组 PCNA LI 为  $0.13 \pm 0.09$  %, 对照组为  $1.40 \pm 0.53$  %, 差异显著( $F = 22.30$ ,  $P = 0.0033$ ); 治疗组 AI 为  $5.09 \pm 0.25$  %, 对照组 AI 为  $0.61 \pm 0.67$  %, 差异显著( $F = 155.13$ ,  $P = 0.0001$ ); 治疗组 MVD 为  $0.06 \pm 0.03$  %, 对照组 MVD 为  $1.09 \pm 0.76$  %, 差异明显( $F = 7.38$ ,  $P = 0.0348$ ).

**结论:** 重组腺病毒携带的融合基因能在荷胃癌裸鼠体内表达出有生物学活性的融合蛋白, 并表现出一定的抑瘤效果.

潘欣, 李喆, 张珉, 王泳, 潘卫, 戚中田. 内皮抑素 - 血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对荷胃癌裸鼠的治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1282-1285  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1282.asp>

## 0 引言

以新生血管作为肿瘤治疗的“靶点”目前已成为国内



外研究的热点<sup>[1-6]</sup>. 内皮抑素可以引起内皮细胞 G1 期阻滞, 特异性抑制血管内皮细胞增生, 促进细胞凋亡<sup>[7-9]</sup>; VEGI<sub>151</sub> 能维持 G0/G1 期细胞生长阻滞, 诱导进入细胞周期的细胞发生凋亡, 使血管内皮系统处于静止状态<sup>[10-13]</sup>. 这两种血管生成抑制因子抑制内皮细胞增生的机制可能差异较大, 但将二者的基因进行融合, 表达出的融合蛋白可能可以阻断肿瘤血管生成的不同环节, 提高治疗效果. 我们利用重组腺病毒携带 hENDO-VEGI<sub>151</sub> 融合基因治疗荷胃癌裸鼠, 以期对肿瘤的抗血管生成基因治疗提供新的思路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 重组腺病毒和 AdLacZ 重组腺病毒为本室包装鉴定, 免抗人 Endostatin 多克隆抗体由德国汉若威的 Stanker 教授惠赠; 由人胚肾上皮细胞经 Ad5 基因片段转染后转化而成的 293 细胞、人胃癌 SGC7903 细胞为本室保存; ♀ 3 周龄 Balb/c 裸小鼠购于本校动物实验中心; HRP 酶标羊抗兔 IgG mAb, DAB, X-gal, DMEM 等均购于华美生物工程公司; 鼠抗人 CD34 mAb 试剂盒、PCNA 免疫组化试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司.

1.2 方法 包装鉴定过的重组腺病毒 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 或 AdCA13-LacZ 50  $\mu$ L 加 200  $\mu$ L 完全培养液感染 293 细胞, 约 2d (48 h) 分别收集呈 CPE 表现的细胞及上清, -70~-37  $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, 所得滤液为粗制重组腺病毒(混合克隆), -70  $^{\circ}$ C 保存. 两种重组腺病毒的滴度用 TCID<sub>50</sub> 法测定.

1.2.1 重组腺病毒治疗荷胃癌裸鼠<sup>[14-18]</sup> 8 只 3 周龄 Balb/c ♀ 裸小鼠, 背部皮下以  $5 \times 10^6$  接种生长良好的 SGC7903 细胞悬液. 待 10 d 长出 2-3 mm 直径的肿瘤后, 随机分成 2 组, 每组 4 只, 瘤体内注射 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 或 AdLacZ 500  $\mu$ L, 隔天注射 1 次, 共注射 10 次. 最后 1 次注射 24 h 后拉断颈椎, 剥离瘤体, 用游标卡尺测量肿瘤短径(a)、长径(b), 按公式  $V = \pi a^2 b / 6$  计算肿瘤体积, 按下式计算抑瘤率: 抑瘤率 = [(对照组肿瘤的平均体积 - 实验组肿瘤的平均体积) / 对照组肿瘤的平均体积]  $\times$  100 %; 称肿瘤质量. 瘤体用 40 g/L 多聚甲醛固定, 常规病理切片, 行苏木精伊红(HE)染色、免疫组化染色及凋亡染色(TUNEL 法)鉴定; 注射 AdLacZ 的剪下部分瘤体, 直接做冰冻切片进行  $\beta$ -半乳糖苷酶报告基因的检测. 冰冻切片用 X-gal 染色液染色、伊红衬染, 镜下观察, 计算重组腺病毒 AdLacZ 感染蓝染细胞面积百分率.

1.2.2 融合蛋白及 PCNA 在胃癌组织中的表达<sup>[19]</sup> 石蜡切片常规脱蜡, 水化, 置 3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 min 后用柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液浸泡组织切片, 微波炉中 95  $^{\circ}$ C, 5 min 修复抗原, 更换柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液后重复 1 次; 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 3 min/次; 加入兔抗人 Endostatin 多抗(1:200) 4  $^{\circ}$ C 过夜; PBS 洗 6 次, 3 min/次; 加入 HRP 酶标羊抗兔 IgG mAb(1:500), 37  $^{\circ}$ C 孵育

40 min, PBS 洗 6 次, 3 min/次; 然后以 DAB 显色 15 min、苏木精衬染、盐酸乙醇分化、脱水、透明、甘油封片后, 光学显微镜检查. PCNA 免疫组化按说明书操作, 阳性表达定位于细胞核, 经免疫组化染色后呈棕黄色. 每组裸鼠观察 4 张切片(以下同), 在 200 倍视野下, 每张切片随机选取 3 个视野, 计算 PCNA 指数(PCNA Label Index, PCNA LI):  $PCNA LI = (\text{阳性细胞面积} / \text{癌细胞总面积}) \times 100 \%$ .

1.2.3 肿瘤组织原位细胞凋亡检测 采用 TdT 介导的 DNA 末端原位标记染色法(TUNEL 法)检测, 按说明书方法操作, 凋亡细胞的细胞核染呈棕黄色. 在 200 倍视野下, 每张切片随机选取 3 个癌区, 计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例. 癌细胞凋亡指数(apoptotic index, AI):  $AI = (\text{凋亡细胞面积} / \text{癌细胞总面积}) \times 100 \%$ .

1.2.4 肿瘤内微血管密度(microvessel density, MVD)测定 采用鼠抗人 CD34 mAb 的标记链霉亲和素 - 生物素免疫组化方法染色, 200 倍视野下, 每张切片计数 3 个血管密度最高区的微血管数并求其均数.

统计学处理 应用 KS400 图像分析系统(carl zeiss)进行形态定量观察, 每张切片随机取 3 个中倍视野( $10 \times 20$ ,  $367\ 855.85\ \mu\text{m}^2$ ), 测定每个视野的阳性面积百分比, 以阳性面积百分比  $\times$  平均灰度作为该视野的染色强度, 3 个视野的平均染色强度作为该例的染色强度. 数据用 SAS 软件做方差分析.

## 2 结果

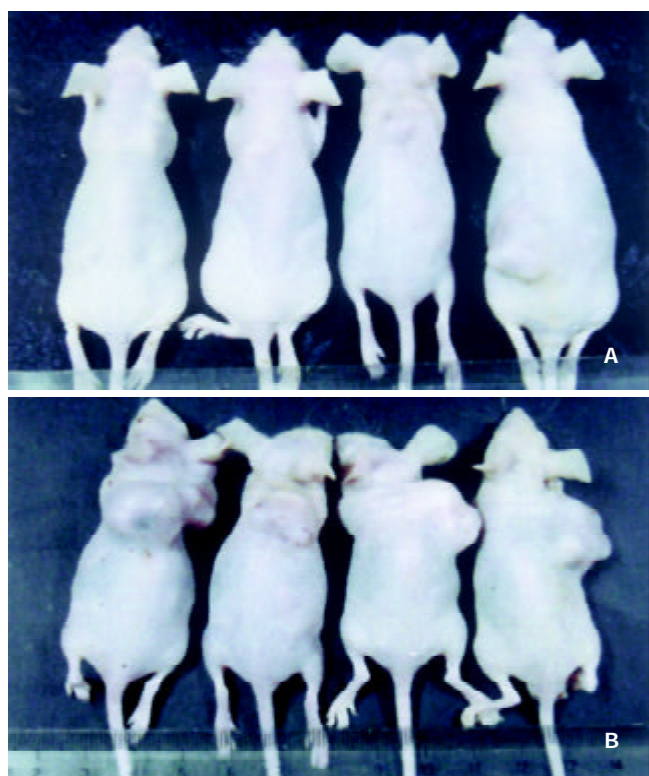
扩增后的两种粗制重组腺病毒用 TCID<sub>50</sub> 法测定病毒滴度均为  $1 \times 10^{12}$  TCID<sub>50</sub>/L. 重组腺病毒 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 经 PCR 鉴定证实融合基因存在.

2.1 重组腺病毒治疗荷胃癌裸鼠 荷胃癌裸鼠经粗制重组腺病毒治疗 20 d 后, 瘤体积明显小于对照组(图 1), 裸鼠其他脏器无肉眼可见的病变. 治疗组(注射 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub>)与对照组(注射 AdLacZ)间的肿瘤体积差异显著( $328 \pm 156\ \text{mm}^3$  vs  $2\ 355.6 \pm 1\ 140.2\ \text{mm}^3$ ,  $F = 12.42$ ,  $P = 0.0125$ ), 抑瘤率为 86.1 %, 治疗组和对照组间肿瘤质量差异显著( $0.34 \pm 0.09\ \text{g}$  vs  $2.47 \pm 0.31\ \text{g}$ ,  $F = 177.69$ ,  $P = 0.001$ ), 注射 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 重组腺病毒有较明显的治疗效果. 注射重组腺病毒 AdLacZ 的胃癌组织冰冻切片, X-gal 染色后组织学检查, 可见胃癌细胞蓝染, 经 KS400 图像分析系统计算, 报告基因 LacZ 经腺病毒转移到裸鼠胃癌细胞中的转染效率为  $59.8 \pm 1.8 \%$  (图 2).

2.2 重组腺病毒 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 及 PCNA 在胃癌组织中的表达 裸鼠胃癌组织切片用兔抗人 Endostatin 多抗免疫组化检测, 细胞质染呈棕黄色(图 3). 裸鼠胃癌组织切片用 PC10 mAb 免疫组化检测, 细胞核染呈棕黄色, 对照组 PCNA LI 为  $1.40 \pm 0.53 \%$ , 治疗组为  $0.13 \pm 0.09 \%$ , 对照组和治疗组间 PCNA LI 差异显著 ( $F = 22.30$ ,  $P = 0.0033$ ).

2.3 原位细胞凋亡检测 切片用 TUNEL 法检测, 细胞核染呈棕黄色, 对照组 AI 为  $0.61 \pm 0.67\%$ , 治疗组为  $5.09 \pm 0.25\%$ , 对照组和治疗组间 AI 差异显著( $F=155.13$ ,  $P=0.0001$ ).

2.4 微血管密度测定 切片用鼠抗人 CD34 mAb 免疫组化检测, 血管内皮细胞染呈棕黄色. 对照组 MVD 为  $1.09 \pm 0.76\%$ , 治疗组为  $0.06 \pm 0.03\%$ , 对照组和治疗组间 MVD 差异明显( $F=7.38$ ,  $P=0.0348$ ).



A: AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 治疗; B: AdLacZ 治疗.  
图1 重组腺病毒瘤内注射治疗 20 d 荷胃癌裸鼠外观.

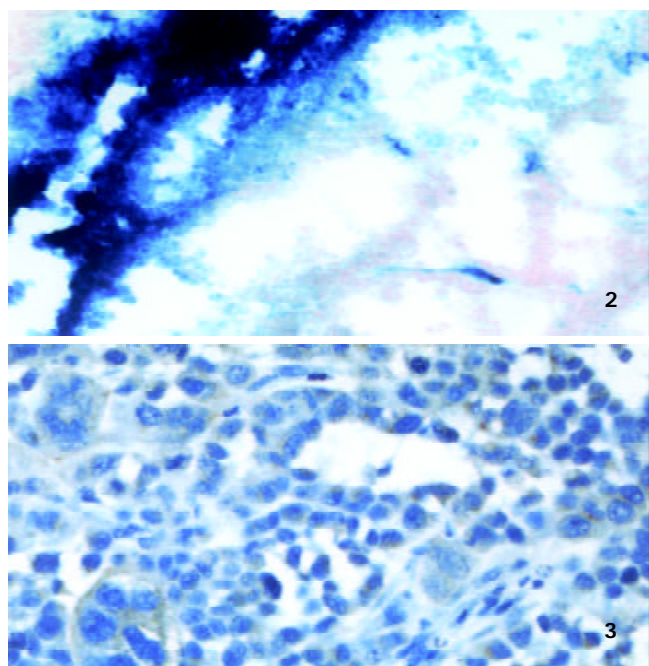


图2 裸鼠胃癌组织 X-gal 染色、冰冻切片伊红衬染.  
图3 AdCA13-hENDO-VEGI<sub>151</sub> 治疗荷胃癌裸鼠的肿瘤组织免疫组化染色图.

### 3 讨论

目前的研究认为, 利用内源性血管生成抑制剂开展基因治疗是较有前途的治疗策略<sup>[20, 21]</sup>. 由于内皮抑素与血管内皮细胞抑制因子均为内源性的蛋白分子, 对肿瘤生长都有较好的抑制作用, 因此我们利用重组腺病毒携带融合的两个强效内源性血管生成抑制基因, 治疗荷胃癌裸鼠, 抑瘤率达到 86.1%. 但肿瘤生长只是被抑制, 延缓, 其大小并没有减小, 与直接注射内皮抑素蛋白使肿瘤消退还存在很大差距. 将 X-gal 染色片与兔抗人 Endostatin 多抗免疫组化检测结果相比较, LacZ 基因的表达效率(阳性面积  $59.8 \pm 1.8\%$ )似乎要高于融合基因的表达效率(阳性面积  $2.03 \pm 0.11\%$ ). 我们认为这两种染色方法本身差异很大.

PCNA 为酸性蛋白, 仅在增生细胞中合成和表达, 是 DNA 多聚酶的一种辅助蛋白, 为 DNA 合成所必需, 在 G<sub>0</sub> 早期不表达, G<sub>1</sub> 期开始表达, S 期达到高峰, G<sub>2</sub>/M 期减少, 是反应细胞增生活性的常用指标<sup>[22-26]</sup>. 本结果表明, 治疗组肿瘤的增生细胞核指数(PCNA LI)显著低于对照组, 说明重组腺病毒表达的融合蛋白对肿瘤的增生能力存在明显的抑制作用, 这种抑制作用是直接引起的还是通过其他途径引起的, 还需进一步阐明. 凋亡是正常细胞或病变细胞主动激发的一种以“自杀”机制, 恶性肿瘤具有无限增生能力的重要原因之一就是丧失自发性凋亡的能力. 凋亡细胞的特征是 DNA 分解, 结果产生 DNA 单链或双链缺口, 我们采用 TUNEL 方法<sup>[27, 28]</sup>, 即在末端脱氧核糖核酸转移酶的作用下, 用地高辛-核苷酸标记两种缺口 3'-OH 末端, 再用酶标记地高辛抗体予以显色. 实验结果表明治疗组肿瘤的凋亡指数(AI)明显高于对照组.

虽然新生血管生成是肿瘤发生和发展过程中的早期事件, 与肿瘤细胞的自发性凋亡是两个既相互独立又相互联系的事件, 但肿瘤细胞的凋亡受肿瘤组织新生血管化程度的影响十分显著. 微血管密度实验能较好地反映新生血管的生成状况<sup>[29, 30]</sup>, 实验结果显示, 治疗组肿瘤的 MVD 明显低于对照组, 说明融合蛋白可能通过抑制内皮细胞增生, 降低微血管密度, 从而降低肿瘤细胞的增生速率, 增加细胞凋亡.

总之, 重组腺病毒携带的融合基因能在裸鼠体内表达出有生物学活性的融合蛋白, 并表现出一定的抑瘤效果. 重组腺病毒表达的融合蛋白, 其治疗效果是否能倍增单基因表达蛋白的治疗效果, 还有待深入研究.

### 4 参考文献

- 1 Tomanek RJ, Schatteman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 2000;261:126-135
- 2 Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4802-4807
- 3 Kleinman HK, Liao G. Gene Therapy for Antiangiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:965-967

- 4 Oehler MK, Bicknell R. The promise of anti-angiogenic cancer therapy. *Br J Cancer* 2000;82:749-752
- 5 Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190:330-337
- 6 Vacca A, Ribatti D, Pellegrino A, Dammacco F. Angiogenesis and anti-angiogenesis in human neoplasms. Recent developments and the therapeutic prospects. *Ann Ital Med Int* 2000;15:7-19
- 7 Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engstrom A, Timpl R, Welsh M, Claesson-Welsh L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 2000;95:3403-3411
- 8 Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, Claesson-Welsh L, Cross MJ. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett* 2003;536:19-24
- 9 Nakashima Y, Yano M, Kobayashi Y, Moriyama S, Sasaki H, Toyama T, Yamashita H, Fukai I, Iwase H, Yamakawa Y, Fujii Y. Endostatin gene therapy on murine lung metastases model utilizing cationic vector-mediated intravenous gene delivery. *Gene Ther* 2003;10:123-130
- 10 Yu J, Tian S, Metheny-Barlow L, Chew LJ, Hayes AJ, Pan H, Yu GL, Li LY. Modulation of endothelial cell growth arrest and apoptosis by vascular endothelial growth inhibitor. *Circ Res* 2001;89:1161-1167
- 11 Zhang M, Wang L, Wang HW, Pan X, Pan W, Qi ZT. Effect of N-terminal deletion on biological activity of vascular endothelial cell growth inhibitor. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2003;35:133-137
- 12 Wang L, Pan W, Zhu FL, Jiao BH, Lou YH, Xiao Y, Qi ZT. Cloning, Expression and biological activity of VEGI(151), a novel vascular endothelial cell growth inhibitor. *Shengwu Hua xue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2000;32:485-489
- 13 Chew LJ, Pan H, Yu J, Tian S, Huang WQ, Zhang JY, Pang S, Li LY. A novel secreted splice variant of vascular endothelial cell growth inhibitor. *FASEB J* 2002;16:742-744
- 14 Zhang GF, Wang YH, Zhang MA, Wang Q, Luo YB, Wang DS, Han CR. Inhibition of growth and metastases of human colon cancer xenograft in nude mice by angiogenesis inhibitor endostatin. *Ai Zheng* 2002;21:50-53
- 15 Zhang X, Liu S, Liang C, Yang H. Adenovirus-mediated Rb gene transfect for head and neck cancer. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2001;32:194-195
- 16 Nicklin SA, Reynolds PN, Brosnan MJ, White SJ, Curiel DT, Dominiczak AF, Baker AH. Analysis of cell-specific promoters for viral gene therapy targeted at the vascular endothelium. *Hypertension* 2001;38:65-70
- 17 Mahasreshti PJ, Navarro JG, Kataram M, Wang MH, Carey D, Siegal GP, Barnes MN, Nettelbeck DM, Alvarez RD, Hemminki A, Curiel DT. Adenovirus-mediated soluble FLT-1 gene therapy for ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:2057-2066
- 18 Wu J, Shi YQ, Wu KC, Zhang DX, Yang JH, Fan DM. Angiostatin up-regulation in gastric cancer cell SGC7901 inhibits tumorigenesis in nude mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:59-64
- 19 Reszec J, Sulkowska M, Famulski W, Guzinska-Ustymowicz K, Sulkowski S. The expression of tumorigenesis markers in oral papilloma. *Pol J Pathol* 2002;53:195-200
- 20 Matsuda KM, Madoiwa S, Hasumi Y, Kanazawa T, Saga Y, Kume A, Mano H, Ozawa K, Matsuda M. A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:589-596
- 21 Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4605-4610
- 22 Norata GD, Tonti L, Roma P, Catapano AL. Apoptosis and proliferation of endothelial cells in early atherosclerotic lesions: possible role of oxidised LDL. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002; 12:297-305
- 23 Konouchi H, Asaumi J, Yanagi Y, Shigehara H, Hisatomi M, Matsuzaki H, Kishi K. Evaluation of tumor proliferation using dynamic contrast enhanced-MRI of oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003;39:290-295
- 24 Noguchi N, Kawashiri S, Tanaka A, Kato K, Nakaya H. Effects of fibroblast growth inhibitor on proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003; 39:240-247
- 25 Ishikawa T, Chen J, Wang J, Okada F, Sugiyama T, Kobayashi T, Shindo M, Higashino F, Katoh H, Asaka M, Kondo T, Hosokawa M, Kobayashi M. Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis. *Oncogene* 2003;22: 1238-1242
- 26 Zorc M, Vraspir-Porenta O, Zorc-Pleskovic R, Radovanovic N, Petrovic D. Apoptosis of myocytes and proliferation markers as prognostic factors in end-stage dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:36-39
- 27 Oberhaus SM. TUNEL and immunofluorescence double-labeling assay for apoptotic cells with specific antigen(s). *Methods Mol Biol* 2003;218:85-96
- 28 Popescu BO, Oprica M, Sajin M, Stanciu CL, Bajenaru O, Predescu A, Vidulescu C, Popescu LM. Dantrolene protects neurons against kainic acid induced apoptosis in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2002;6:555-569
- 29 Fu QH, Yu H, Wang QQ, Wu QL. Antiangiogenesis effect of linomide in treatment of transplanted human oral carcinoma in nude mice and its relations to regulation on cytokine secretion of macrophage. *Zhejiang Daxue Xuebao Yixuebao* 2002; 31:273-276
- 30 Olewniczak S, Chosia M, Kwas A, Kram A, Domagala W. Angiogenesis and some prognostic parameters of invasive ductal breast carcinoma in women. *Pol J Pathol* 2002;53:183-188



# PKC $\beta$ 1 和 PKC $\beta$ 2 在早期胃癌中的表达

冯瑞娥, 陈 杰, 崔全才, 詹 阳, 王振宇

冯瑞娥, 陈杰, 崔全才, 詹阳, 中国医学科学院北京协和医院病理科  
北京市 100730  
王振宇, 香港大学玛丽医院消化内科 香港  
冯瑞娥, 女, 1964-01-07 生, 汉族. 1985 年河北医科大学本科毕业, 1988  
年首都医科大学硕士研究生毕业, 主治医师. 主要从事病理临床诊断和胃癌  
病理研究.  
项目负责人: 冯瑞娥, 100730, 北京市东城帅府园 1 号, 中国医学科学院北  
京协和医院病理科. fengre@hotmail.com  
电话: 010-65295521 传真: 010-65295520  
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-03

## Expression of PKC $\beta$ 1 and PKC $\beta$ 2 in early gastric carcinoma

Rui-E Feng, Jie Chen, Quan-Cai Cui, Yang Zhan, Zhen-Yu Wang

Rui-E Feng, Jie Chen, Quan-Cai Cui, Yang Zhan, Department of  
Pathology, Peking Union Medical Hospital, Beijing 100730, China  
Zhen-Yu Wang, Queen Mary Hospital, Hong Kong University, Hong Kong  
Correspondence to: Rui-E Feng, Department of Pathology, Peking  
Union Medical Hospital, Beijing 100730, China. fengre@hotmail.com  
Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-03

## Abstract

**AIM:** To study the expression of PKC  $\beta$ 1 and PKC  $\beta$ 2 in carcinoma tissue, dysplasia and intestinal metaplasia of early gastric carcinoma.

**METHODS:** Forty two cases of early gastric carcinoma were randomly selected from the file of PUMH during 1998-2001. The expression of PKC  $\beta$ 1 and PKC  $\beta$ 2 was investigated by immunohistochemistry method. The staining pattern of PKC  $\beta$ 1 and PKC  $\beta$ 2 was compared among carcinoma, dysplasia, intestinal metaplasia, and normal gastric tissue.

**RESULTS:** In normal gastric mucosa, PKC  $\beta$ 1 and PKC  $\beta$ 2 were strongly positive in fundic glandular epithelium, but negative in pyloric and entire surface of mucine-secretion epithelial cells. PKC  $\beta$ 1 showed positive staining not only in the glandular cells at the neck region and but also in the follicular center cells of lymphoid tissue. However, PKC  $\beta$ 2 was negative in those areas. Most importantly, PKC  $\beta$ 1 demonstrated much stronger staining in carcinoma, dysplasia and intestinal metaplasia, especially in intestinal carcinoma, compared to normal gastric mucosa. There was no significant difference of PKC  $\beta$ 1 positivity between intramucosa carcinoma and submucosa carcinoma.

**CONCLUSION:** The expression of PKC  $\beta$ 1 may be related to the proliferation of gastric epithelium. Our findings strongly indicate that elevated expression of PKC  $\beta$ 1 may be an early event in the pathway of gastric carcinogenesis.

Feng RE, Chen J, Cui QC, Zhan Y, Wang ZY. Expression of PKC  $\beta$ 1 and PKC  $\beta$ 2 in early gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003; 11(9):1286-1289

## 摘要

**目的:** 观察 PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 在早期胃癌组织及其癌周不典型增生和肠上皮化生中的表达.

**方法:** 对 42 例早期胃癌胃全切标本的癌组织、癌旁不典型增生、肠上皮化生及正常胃黏膜进行 PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 免疫组织化学染色.

**结果:** 正常胃黏膜上皮颈部散在 PKC  $\beta$ 1 阳性细胞, 黏膜表面上皮细胞及幽门腺 PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 阴性; 胃底腺壁细胞和主细胞 PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 呈强阳性. 胃黏膜内淋巴滤泡中心区 PKC  $\beta$ 1 强阳性, PKC  $\beta$ 2 阴性; 相反, 淋巴滤泡帽带区 PKC  $\beta$ 1 阴性, 而 PKC  $\beta$ 2 强阳性. 胃癌、癌旁不典型增生、肠上皮化生 PKC  $\beta$ 1 的表达明显增强, 而 PKC  $\beta$ 2 的表达无明显增强. 肠型胃癌 PKC  $\beta$ 1 的表达明显高于弥漫型. PKC  $\beta$ 1 的表达与早期胃癌的浸润深度无关.

**结论:** PKC  $\beta$ 1 在胃黏膜腺上皮颈部和淋巴滤泡中心的强阳性表达提示 PKC  $\beta$ 1 可能与细胞的增生活性有关; 胃癌及癌前病变中 PKC  $\beta$ 1 的表达增强显示 PKC  $\beta$ 1 参与了胃癌的癌变过程, 并可能在癌变早期发生改变.

冯瑞娥, 陈杰, 崔全才, 詹阳, 王振宇. PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 在早期胃癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1286-1289

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1286.asp>

## 0 引言

蛋白激酶 (protein kinase, PKC) 是一组广泛分布的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶同功酶, 可催化多种底物蛋白丝氨酸/苏氨酸残基的磷酸化, 影响细胞生物信息的传递和细胞内环境的稳定. PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 为 PKC $\beta$  基因通过旁路剪接编码的 2 个不同的蛋白, 二者基因组成中只有羧基末端最后的 50 个氨基酸成分不同. 近年来, 研究表明 PKC 在多种肿瘤细胞的癌变、转移、凋亡及肿瘤对化疗药物的敏感性等过程中发挥重要作用<sup>[1-9]</sup>. 文献报道, PKC  $\beta$  在早期前列腺癌中的表达明显下降<sup>[10]</sup>. 在致肠癌的小鼠中, PKC  $\beta$ 2 在癌组织及癌前病变中的表达增强<sup>[11]</sup>. 因此, 推测他们是前列腺癌和肠癌癌变早期发生改变. PKC  $\beta$ 1 的过表达可以抑制消炎痛诱发的胃癌细胞株的凋亡<sup>[12]</sup>. PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 在早期胃癌及癌前病变中的表达国内外文献均未见报道.

胃癌癌变是一个多种因素参与的连续性病变过程. 特别是肠上皮化生、不典型增生作为胃癌的癌前病变

引起临床的重视. 我们将观察PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2在早期胃癌患者癌组织、癌旁肠上皮化生、不典型增生和正常胃黏膜的表达. 从而推测PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2在胃癌癌变过程中的作用.

## 1 材料和方法

北京协和医院 1998/2001 年早期胃癌切除标本 42 例, 癌组织及其周围约 2 cm 范围组织全部取材, 并按 1:1 比例画图, 标注每一组织块部位. 石蜡包埋, 常规制片. 显微镜下标注每张切片肿瘤部位, 再对应标注于图上, 按图所示测量肿瘤大小. 按 Lanren 分型把胃癌分为肠型、弥漫型和混合型.

选取每例癌组织、癌旁不典型增生、肠上皮化生所在组织块, 把无上述病变的部位视为相对正常胃黏膜. 对以上部位进行Envision法免疫组织化学染色. PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2均购自 Santa Cruz, PKC $\beta$ 1: Cat No. SC-209 cPKC (C-16) rabbit; PKC  $\beta$ 2: Cat No. SC-210-G cPKC II (C-18) Goat. 其他免疫组化所用试剂均购自 Dako. 免疫组化采用 Envision 二步法. 具体为: 切取 5 mm 厚切片, 常规脱蜡, 水化, 切片置于微波炉内处理 15 min, PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2浓度均为 1:50, 孵浴 30 min. Envision TM 孵浴 10 min. DAB 显色, 苏木素复染, 封片. 扁桃体组织作为阳性对照; 阴性对照中一抗改为兔及羊血清.

显微镜下观察PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2在每例癌组织、癌旁不典型增生、肠上皮化生及正常胃黏膜中的表达. 选取典型视野计数阳性细胞数, 阳性细胞数小于 10 % 为阴性, 10-50 % 为弱阳性(+), 大于 50 % 为强阳性(++). 数据经  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

42 例早期胃癌, 男 34 例, 女 7 例, 年龄 29-76 岁; 肠型胃癌 27 例, 弥漫型 12 例, 混合型 3 例; 22 例癌组织局限于黏膜内, 20 例癌组织侵及黏膜下层. 1 例有胃周淋巴结转移.

免疫组化染色 PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2均位于细胞胞质内, 呈棕黄色颗粒状. 42 例癌周正常胃黏膜中, 黏膜上皮颈部散在 PKC  $\beta$ 1 阳性细胞 (图 1), 幽门腺黏液上皮细胞及黏膜表面上皮细胞 PKC  $\beta$ 1 阴性. 17 例癌周正常胃黏膜中可见胃底腺, 胃底腺壁细胞和主细胞 PKC  $\beta$ 1 呈强阳性 (图 2). 33 例切片胃黏膜可见淋巴滤泡, 滤泡中心细胞 PKC  $\beta$ 1 强阳性, 帽带区淋巴细胞呈阴性 (图 3). 胃黏膜间质中的淋巴细胞和浆细胞阳性.

42 例胃癌组织中, 29 例癌细胞胞质 PKC $\beta$ 1 强阳性, 4 例弱阳性, 8 例阴性. 29 例癌周可见不典型增生上皮, PKC  $\beta$ 1 在 22 例不典型增生上皮呈强阳性 (图 4), 5 例弱阳性, 2 例阴性. 34 例癌周可见肠上皮化生, 其中 14 例 PKC  $\beta$ 1 强阳性 (图 5), 14 例弱阳性, 6 例阴性. 与正常胃黏膜相比, 癌组织、癌旁不典型增生及肠上皮化生中 PKC  $\beta$ 1 的表达明显增强 ( $P < 0.001$ ), 而三者之

间相比无明显差异 ( $P > 0.05$ , 表 1).

表 1 PKC  $\beta$ 1 在不同胃黏膜组织中的表达强度

	PKC $\beta$ 1		
	++	+	-
胃癌	29	4	8
肠型	23	3	1
弥漫型	3	2	7
混合型	3	0	0
黏膜内癌	17	2	3
黏膜下癌	12	3	5
不典型增生	22	3	5
肠化	14	14	6
正常	0	0	42

27 例肠型胃癌中, 23 例癌细胞胞质 PKC  $\beta$ 1 强阳性 (图 6), 3 例弱阳性, 1 例阴性; 12 例弥漫型胃癌, 3 例 PKC  $\beta$ 1 强阳性, 2 例弱阳性, 7 例阴性. 二者比较 PKC  $\beta$ 1 在肠型胃癌中的表达明显增强, ( $P < 0.001$ , 表 1).

22 例癌组织局限于黏膜内, 其中, 17 例呈强阳性, 2 例弱阳性, 3 例阴性. 20 例癌组织侵及黏膜下层, 其中, 12 例呈强阳性, 3 例弱阳性, 5 例阴性. 二者比较 PKC  $\beta$ 1 的表达无明显差异, ( $P > 0.05$ , 表 1).

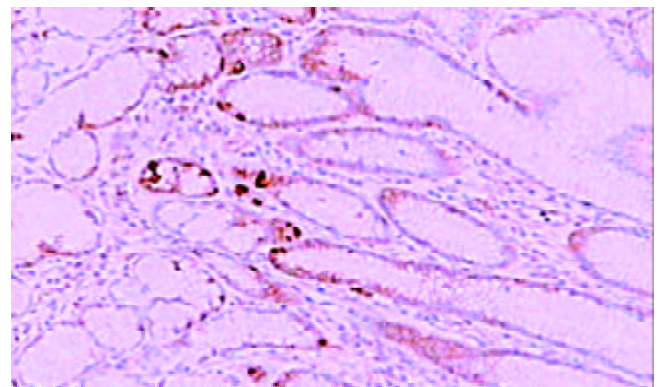


图 1 PKC  $\beta$ 1 在正常胃黏膜腺上皮颈部散在阳性  $\times 60$ .

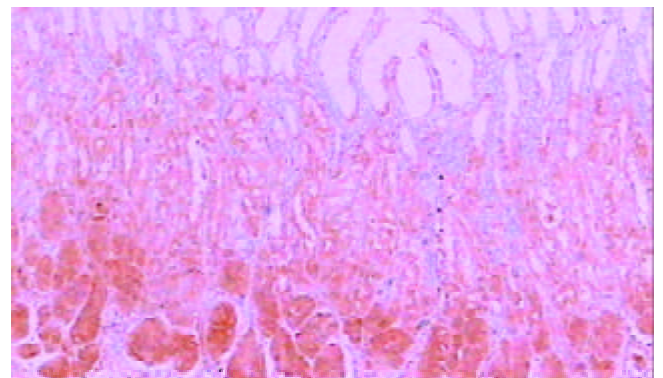


图 2 PKC  $\beta$ 1 在胃底腺阳性  $\times 60$ .

PKC  $\beta$ 2 在癌周正常胃黏膜表面上皮细胞阴性, 幽门腺黏液上皮细胞阴性. 17 例癌周正常胃黏膜中可见胃



底腺,胃底腺壁细胞和主细胞 PKC  $\beta$ 2 呈强阳性(图7). 33 例切片胃黏膜可见淋巴滤泡,滤泡中心细胞 PKC $\beta$ 2 阴性,帽带区淋巴细胞呈强阳性(图8). 胃黏膜间质中的淋巴细胞和浆细胞阳性.

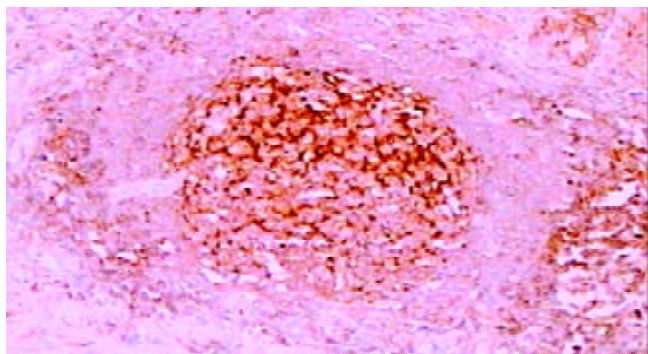


图3 PKC  $\beta$ 1在胃黏膜淋巴滤泡中心区阳性,帽带区及周边区阴性 $\times 100$ .

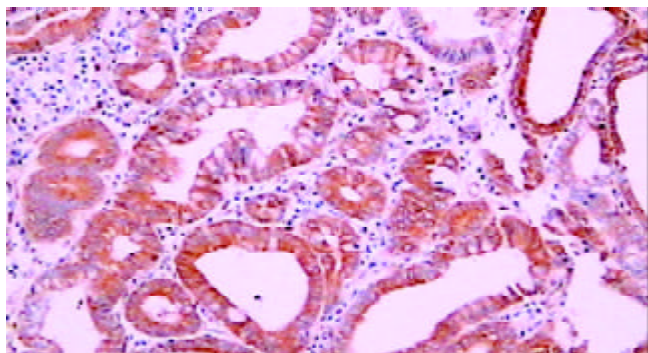


图4 PKC  $\beta$ 1在不典型增生中阳性 $\times 100$ .

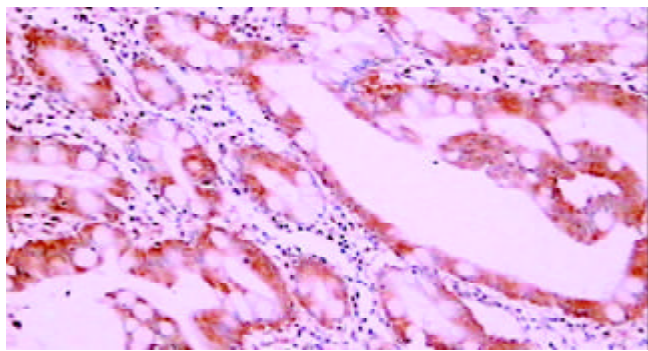


图5 PKC  $\beta$ 1在肠上皮化生中阳性 $\times 100$ .

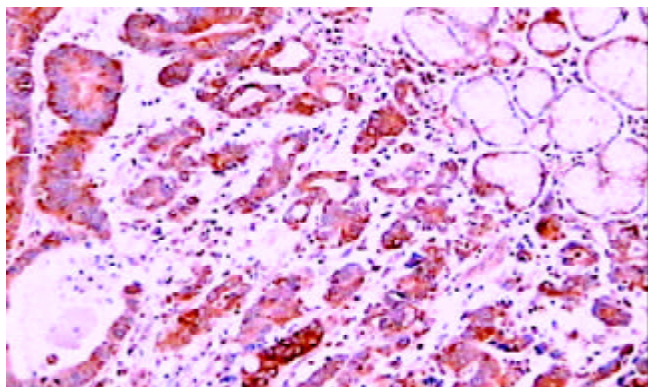


图6 PKC  $\beta$ 1在肠型胃癌中阳性 $\times 100$ .

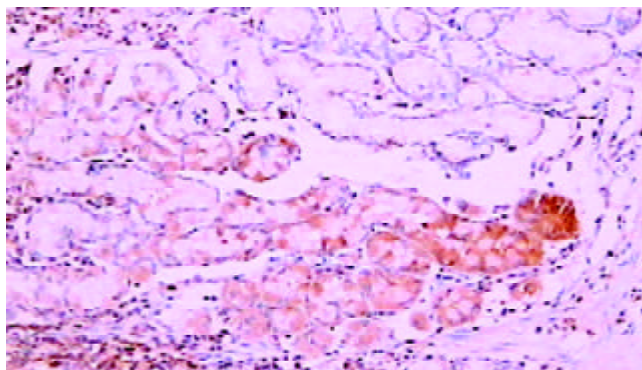


图7 PKC  $\beta$ 2在胃底腺阳性,幽门腺阴性 $\times 60$ .

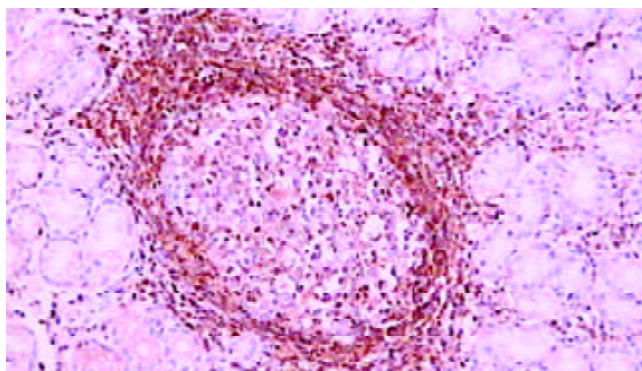


图8 PKC  $\beta$ 2在胃黏膜淋巴滤泡中心区阴性,帽带区阳性 $\times 60$ .

42 例胃癌组织中,3 例癌细胞胞质 PKC  $\beta$ 2 弱阳性,29 例阴性. 37 例癌周可见不典型增生上皮,PKC  $\beta$ 2 在 2 例不典型增生上皮呈弱阳性,35 例阴性. 34 例癌周可见肠上皮化生,均呈 PKC  $\beta$ 2 阴性. 与正常胃黏膜相比,癌组织、癌旁不典型增生及肠上皮化生中 PKC  $\beta$ 2 的表达无明显增强,三者之间相比无明显差异.

### 3 讨论

关于 PKC 与胃癌的关系的研究,文献中主要用体外胃癌细胞株或测定胃癌组织 PKC 的活性<sup>[13-18]</sup>. PKC 各同功酶亚型在胃癌组织及胃正常黏膜中的表达和定位未见研究报道.因此,我们对早期胃癌组织及其周围癌前病变和正常黏膜进行免疫组织化学染色,观察他们在以上组织中的表达和定位.我们首次报道了 PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 在正常胃黏膜组织的表达及分布. PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 在正常胃黏膜上皮细胞、幽门腺黏液细胞阴性,胃底腺壁细胞和主细胞阳性.胃黏膜淋巴滤泡中心区 PKC  $\beta$ 1 阳性,PKC  $\beta$ 2 阴性.帽带区 PKC  $\beta$ 2 阳性,PKC  $\beta$ 1 阴性. PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 在胃底腺壁细胞和主细胞中的强阳性表达提示他们可能与胃底腺的分泌活动有关.我们注意到有实验测定胃癌和胃正常组织 PKC  $\beta$  的活性,以比较二者的不同,我们建议应用此方法时正常组织的选取应分清胃窦和胃体及胃底,以避免胃底腺对结果的影响.

PKC  $\beta$ 1 和 PKC  $\beta$ 2 是 PKC  $\beta$  基因通过旁路剪接编码的 2 个不同的蛋白,二者基因组成中只有羧基末端



最后的50个氨基酸成分不同,但二者具有相反的生物作用.本实验显示PKC  $\beta$ 2与PKC  $\beta$ 1在早期胃癌及胃正常黏膜的表达截然不同,在早期胃癌、癌旁不典型增生及肠上皮化生中PKC  $\beta$ 1的表达增强,PKC  $\beta$ 2无明显改变.在正常胃黏膜淋巴滤泡中心区PKC  $\beta$ 1强阳性,PKC  $\beta$ 2阴性;相反,帽带区PKC  $\beta$ 1阴性,PKC  $\beta$ 2阳性.

PKC根据发生作用时协同因子的不同,分为三组,共12种同功酶亚型.其中,传统型PKC包括 $\alpha$ 、 $\beta$ 1、 $\beta$ 2和 $g$ ,4个同功酶亚型.各种PKC同功酶亚型在不同肿瘤中的作用不同<sup>[19-23]</sup>,文献报道,在致肠癌的小鼠中,PKC  $\beta$ 2在癌组织及癌前病变中的表达增强<sup>[11]</sup>,膀胱正常组织和低度恶性移行细胞癌中PKC  $\beta$ 2的表达增强,而高低恶性肿瘤中的表达减弱<sup>[24]</sup>,本结果显示,PKC  $\beta$ 2在早期胃癌癌前病变和正常组织中的表达未见明显差异.

本实验显示PKC  $\beta$ 1在早期胃癌、癌旁不典型增生及肠上皮化生中的表达明显增强.表明PKC  $\beta$ 1的表达在胃癌及其癌前病变中发生改变.PKC  $\beta$ 1在不典型增生及肠上皮化生中的表达增强,提示PKC  $\beta$ 1在胃癌中的改变可能发生在癌变早期.肠型胃癌与弥漫型比较,PKC  $\beta$ 1在肠型胃癌中的表达明显增强.

PKC  $\beta$ 1在胃黏膜上皮颈部和淋巴滤泡中心区呈强阳性表达,以上部位均为细胞增生活性较强的部位,因此PKC  $\beta$ 1可能与细胞的增生活性有关.增生活性是胃癌癌变中的一个重要因素.与我们以上的推测相一致,体外胃癌细胞株研究表明PKC的活性与胃癌细胞的调亡有关<sup>[25]</sup>,PKC  $\beta$ 1能抑制胃癌细胞的调亡,其作用可能与p21(waf1/cip1)有关<sup>[12]</sup>.

有文献报道,PKC $\beta$ 与胃癌细胞株的浸润性相关,PKC  $\beta$ 抑制剂能降低胃癌细胞株的生长和血管的形成.为了观察PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2的表达与胃癌浸润性的关系,我们把早期胃癌分为癌组织局限于黏膜内和浸润到黏膜下两组,结果表明,此两组PKC  $\beta$ 1和PKC  $\beta$ 2的表达未见明显差异.PKC与胃癌浸润性的关系尤待大样本进一步的研究.

#### 4 参考文献

- Buchner K. The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:1-11
- Way D, Smith S, Sivendran S, Chie L, Kanovsky M, Brandt-Rauf PW, Chung DL, Michl J, Pincus MR. A protein kinase C inhibitor induces phenotypic reversion of ras-transformed pancreatic cancer cells and cooperatively blocks tumor cell proliferation with an anti-ras peptide. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;49:429-437
- Goekjian PG, Jirousek MR. Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:2117-2140
- Carter CA. Protein kinase C as a drug target: implications for drug or diet prevention and treatment of cancer. *Curr Drug Targets* 2000;1:163-183
- Garcia-Fernandez LF, Losada A, Alcaide V, Alvarez AM, Cuadrado A, Gonzalez L, Nakayama K, Nakayama KI, Fernandez-Sousa JM, Munoz A, Sanchez-Puelles JM. Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta. *Oncogene* 2002;21:7533-7544
- 马强, 张振书, 张亚历, 王群英, 赖卓胜. 蛋白激酶C对大肠癌耐药株LoVo/Adr细胞多药耐药性的影响. *第一军医大学学报* 2002;22:626-628
- Sagawa N, Fujita H, Banno Y, Nozawa Y, Katoh H, Kuzumaki N. Gelsolin suppresses tumorigenicity through inhibiting PKC activation in a human lung cancer cell line, PC10. *Br J Cancer* 2003;88:606-612
- Jarzabek K, Laudanski P, Dzieciol J, Dabrowska M, Wolczynski S. Protein kinase C involvement in proliferation and survival of breast cancer cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2002;40:193-194
- Masanek U, Stammer G, Volm M. Modulation of multidrug resistance in human ovarian cancer cell lines by inhibition of P-glycoprotein 170 and PKC isoenzymes with antisense oligonucleotides. *J Exp Ther Oncol* 2002;2:37-41
- Cornford P, Evans J, Dodson A, Parsons K, Woolfenden A, Neoptolemos J, Foster CS. Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer. *Am J Pathol* 1999;154:137-144
- Gokmen-Polar Y, Murray NR, Velasco MA, Gatalica Z, Fields AP. Elevated protein kinase C betaII is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61:1375-1381
- Zhu GH, Wong BC, Slosberg ED, Eggo MC, Ching CK, Yuen ST, Lai KC, Soh JW, Weinstein IB, Lam SK. Overexpression of protein kinase C-beta1 isoenzyme suppresses indomethacin-induced apoptosis in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2000;118:507-514
- Atten MJ, Attar BM, Milson T, Holian O. Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C: mediated mechanism. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1423-1432
- Teicher BA, Menon K, Alvarez E, Galbreath E, Shih C, Faul MM. Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in human HT-29 colon carcinoma and human CaKi1 renal cell carcinoma xenografts. *Anticancer Res* 2001;21:3175-3184
- Han Y, Han ZY, Zhou XM, Shi R, Zheng Y, Shi YQ, Miao JY, Pan BR, Fan DM. Expression and function of classical protein kinase C isoenzymes in gastric cancer cell line and its drug-resistant sublines. *World J Gastroenterol* 2002;8:441-445
- 韩英, 时永全, 李铃. 蛋白激酶C同功酶PKC  $\alpha$ 及PKC  $\beta$ 1在胃癌及其耐药细胞中的表达和功能. *中华肿瘤杂志* 2001;23:103-106
- 韩英, 时永全, 张宏博. 肿胀激活状态下蛋白激酶C同功酶亚型在胃癌耐药细胞系的亚细胞分布变化及其意义. *中华医学杂志* 2001;81:328-331
- Uchida N, Okamura S, Kuwano H. Protein kinase C activity in human gastric carcinoma. *Oncol Rep* 2000;7:793-796
- Wu D, Foreman TL, Gregory CW, McJilton MA, Wescott GG, Ford OH, Alvey RF, Mohler JL, Terrian DM. Protein kinase cepsilon has the potential to advance the recurrence of human prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:2423-2429
- Schondorf T, Kurbacher CM, Becker M, Warm M, Kolhagen H, Gohring UJ. Heterogeneity of protein kinase C activity and PKC-zeta expression in clinical breast carcinomas. *Clin Exp Med* 2001;1:1-8
- Masso-Welch PA, Winston JS, Edge S, Darcy KM, Asch H, Vaughan MM, Ip MM. Altered expression and localization of PKC eta in human breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2001;68:211-223
- Clark AS, West KA, Blumberg PM, Dennis PA. Altered protein kinase C (PKC) isoforms in non-small cell lung cancer cells: PKCdelta promotes cellular survival and chemotherapeutic resistance. *Cancer Res* 2003;63:780-786
- Ding L, Wang H, Lang W, Xiao L. Protein kinase C-epsilon promotes survival of lung cancer cells by suppressing apoptosis through dysregulation of the mitochondrial caspase pathway. *J Biol Chem* 2002;277:35305-35313
- Langzam L, Koren R, Gal R, Kugel V, Paz A, Farkas A, Sampson SR. Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *Am J Clin Pathol* 2001;116:377-385
- Izawa M, Teramachi K. Down-regulation of protein kinase C activity by sorbitol rapidly induces apoptosis in human gastric cancer cell lines. *Apoptosis* 2001;6:353-358

# 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响

张良运, 凌 晖, 苏 琦, 宋 颖, 梁晓秋

张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 南华大学肿瘤研究所 湖南省衡阳市 421001  
梁晓秋, 中国科学院生物物理研究所 北京市 100101  
张良运, 男, 1972-05-21 生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 2001 年南华大学病理学硕士毕业, 现在广东省佛山市人民医院病理科工作。  
湖南省科委基金资助课题, No. 97610319, No. 00SSY3019  
湖南省自然科学基金课题, No. 01JJY2146, No. 02JJY2026  
项目负责人: 苏琦, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学肿瘤研究所. sq8888@cmmail.com  
电话: 0734-8281547 传真: 0734-8281547  
收稿日期: 2002-10-17 接受日期: 2002-11-30

## Inhibitory effect of diallyl disulfide on human gastric cancer cell line MGC803 *in vitro*

Liang-Yun Zhang, Hui Ling, Qi Su, Ying Song, Xia-Qiu Liang

Liang-Yun Zhang, Hui Ling, Qi Su, Ying Song, Institute of Oncology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China  
Xia-Qiu Liang, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China  
Supported by the Science and Technology Commission Foundation of Hunan Province, No. 97610319, No. 00SSY3019, and the National Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 01JJY2146, No. 02JJY2026.  
Correspondence to: Dr. Qi Su, Institute of Oncology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province China. sq8888@cmmail.com  
Received: 2002-10-17 Accepted: 2002-11-30

## Abstract

AIM: To investigate the effect of diallyl disulfide (DADS) on human gastric cancer MGC803 cell line *in vitro*.

METHODS: The effect of DADS was confirmed by MTT assay, cell growth curve analysis, cell viability detection, clony formation in soft agar and inversion microscopy.

RESULTS: *In vitro* growth of MGC803 cells was significantly inhibited by DADS in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ) when MGC803 cells were cultured for 96 hours, and at a higher concentration of 35 mg/L. The inhibiting effect of DADS displayed a time-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Cell viability decreased from 97.4 % in negative control group to 80.4 % in treatment group. There was no significance existed between the two groups ( $P > 0.05$ ), and average doubling time was delayed from 33.75 h in negative control group to 84.0 h in treatment group ( $P < 0.05$ ). Clony formation ratio was also decreased from 1.23 % in negative control group to 0.33 % in treatment group ( $P < 0.05$ ). After treated by DADS, MGC803 cells showed pleomorphic and atypia declining, small size, uniform spindle shape, abundant cytoplasm and smaller nuclei. All these appeared in 20 mL/L DMSO treated MGC803 cells as well as in DADS-exposed cells.

CONCLUSION: The effect of growth inhibition of DADS on human gastric cancer MGC803 cells *in vitro* is significant

and exhibits a dose-dependent manner.

Zhang LY, Ling H, Su Q, Song Y, Liang XQ. Inhibitory effect of diallyl disulfide on human gastric cancer cell line MGC803 *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1290-1293

## 摘要

目的: 研究二烯丙基二硫(DADS)对人胃癌MGC803细胞生长的抑制作用。

方法: 采用 MTT 法、生长曲线分析、细胞活力检测、双层软琼脂集落形成率、及倒置显微镜等方法, 观察 DADS 对体外培养的人胃癌 MGC803 细胞的影响。

结果: DADS 对 MGC803 细胞具有明显的生长抑制效应, 且呈剂量 - 效应依赖关系 ( $P < 0.05$ )。培养 96 h, 35 mg/L DADS 的抑制作用呈时间 - 效应依赖关系 ( $P < 0.05$ )。细胞群体倍增时间由 33.8 h 延长至 DADS 处理后的 84.0 h ( $P < 0.05$ ); 细胞存活率分别为阴性对照组 97.4 % 和 DADS 处理组 80.4 % ( $P > 0.05$ ); 软琼脂集落形成率由 1.23 % 下降到 0.33 % ( $P < 0.05$ )。阴性对照组细胞多角形、圆形, 体积大, 多形性明显, 核大小不一, 见双核及核仁, 细胞生长紧密呈堆叠生长。DADS 处理后细胞异型性降低, 为形态一致的梭形, 体积小, 境界清楚而分散, 胞质丰富, 核明显变小。

结论: DADS 对体外培养的 MGC803 细胞具有明显的增生抑制作用, 且呈现剂量 - 效应依赖关系。

张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 梁晓秋. 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1290-1293

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1290.asp>

## 0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-9]</sup>, 尤其在我国的发病率和死亡率仍居首位<sup>[10-12]</sup>。流行病学调查显示, 食用大蒜可以减少胃癌的发生率与死亡率<sup>[13]</sup>。研究表明, 大蒜及其烯丙基硫化物对结肠癌、白血病、乳腺癌、肺癌等均有明显的抑制作用<sup>[14-17]</sup>。本室以前研究证实大蒜可以抑制 MNNG 诱发大鼠腺胃癌和癌前病变<sup>[18]</sup>, 同时具有抗突变、抗癌变和促进淋巴细胞转化等功能<sup>[19-22]</sup>, 并发现二烯丙基三硫(diallyl trisulfide, DATS)可抑制胃癌 MGC803 细胞生长<sup>[23]</sup>。现研究不同浓度的二烯丙基二硫(diallyl disulfide, DADS)对体外培养的人胃癌 MGC803 细胞的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** MGC803 细胞(为人胃低分化黏液癌, 山东师范大学生物系建株, 从湖南医科大学肿瘤所引进)用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 (GIBCO)培养液置 37 °C, 含 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 恒湿、恒温培养箱中培养。取对数生长期细胞, 按所需细胞浓度接种于培养瓶或培养板内, 待细胞完全贴壁 6 h 后, 换用含或不含药物的培养液培养至预定时间。实验设立不同浓度的 DADS (Fluka,  $d_4^{20}=1.0$ ,  $M_r$  146.28, 纯度 80 %, 含 10-20 % DAS)、DAS (Fluka,  $d_4^{20}=0.887$ ,  $M_r$  114.21, 纯度 97 %)处理组, 20 mL/L DMSO 的阳性对照组, Tween 80+ 生理盐水溶媒对照组以及常规培养的阴性对照组。

**1.2 方法** 取对数生长期细胞, 接种于 96 孔平底培养板, 细胞贴壁 6-8 h 后, 加入处理因素, 继续培养 96 h。然后加入 5 g/L MTT (AMRESCO) 20  $\mu$ L 液培养 6 h 即终止培养。加入 DMSO (SIGMA)振摇 10 min, 以溶解细胞内外形成的甲簪, 置酶联免疫检测仪以空白对照组调零, 读取各孔 A<sub>570</sub> 值(取 6 复孔)。按公式计算: 抑制率(IR %)=(1 - 实验组 A<sub>570</sub> 值/0 对照组 A<sub>570</sub>) $\times$ 100 %。细胞活力检测采用台盼蓝排斥法, 倒置显微镜下计数活细胞与死细胞。按公式计算: 细胞活力(%)=活细胞数/(活细胞数+死细胞数) $\times$ 100 %。双层琼脂糖集落形成实验用三蒸水制备 15 g/L 和 9 g/L 两个浓度的低熔点琼脂糖溶液, 高温高压灭菌后维持于 40 °C 水浴中; 同时制备 3 $\times$ RPMI1640 培养液(含 300 mL/L 小牛血清和 3 倍双抗), 保存于 37 °C 温箱中。临用时 1:2 混合琼脂糖与 3 $\times$ RPMI1640 培养液, 调整细胞浓度使最终细胞接种量为 1000 个/孔。每组 3 个平行样本, 2 wk 后观察集落形成情况并计数集落数, 计算集落形成率。取对数生长期细胞, 接种于 24 孔培养板。每 24 h 取 3 孔细胞计数, 每孔记数 4 次, 求出三孔细胞的均值, 连续 96 h 绘制生长曲线。肿瘤细胞群体倍增时间 T<sub>D</sub> 按公式计算:  $T_D = t \times \lg 2 / \lg (N_t / N_0)$  ( $N_t$  为 t 时间的细胞数,  $N_0$  为初种细胞数)。对活细胞在接触处理因素前后细胞形态学及生长状况的变化进行动态观察。

统计学处理 采用 SPSS10.0 for Windows 统计软件进行方差分析、 $\chi^2$  检验、协方差分析及 Poisson 分布分析, 确定 P < 0.05 为差异有显著性统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MTT 法测细胞的吸光度 A<sub>570</sub>** DADS 浓度由 20 mg/L<sup>-1</sup> 增至 45 mg/L 时, MGC803 细胞的生长抑制率由 15.1 % 提高到 65.8 %, 呈明显的浓度依赖关系, 且表明 DADS 对 MGC803 细胞的 IC<sub>50</sub> 在 25-30 mg/L 之间(表 1)。方差分析显示, 各浓度组之间均有显著性差异(P < 0.05)。根据表 3 的结果绘制 DADS 对 MGC803 细胞生长抑制效应量-效应曲线图 1。当 DAS 浓度在 40-100 mg/L 时, 对 MGC803 细胞生长具有一定的抑制作用, 抑制率由 6 % 递增至 20 % (表 2), 但浓度低于 40 mg/L 时, 其对 MGC803 细

胞的生长几无影响。在 DADS 溶液的实验浓度范围内, DAS 最大含量为 10 mg/L, 此浓度对 MGC803 细胞生长无影响。可以认为 DADS 溶液对 MGC803 细胞的生长以抑制作用是由其单一成分 DADS 作用所致。DMSO 对 MGC803 细胞的生长抑制作用也呈现出浓度依赖关系。当 DMSO 浓度由 1.0 % 增加到 2.5 % 时, 生长抑制率由 11.3 % 递增至 57.5 %。方差分析, 各浓度组之间有显著性差异(P < 0.05, 表 3)。DMSO 对 MGC803 细胞的 IC<sub>50</sub> 值接近于 2.0 %。本实验选取 2.0 % 的 DMSO 作为阳性对照。

表 1 DADS 处理 MGC803 细胞 96 h 内的吸光度值(n=6)

	DADS (mg/L)						
	0	20	25	30	35	40	45
$\bar{x} \pm s$	0.73	0.62	0.46	0.34	0.27	0.27	0.25
	0.068	0.038	0.049	0.055	0.065	0.024	0.051
抑制率(%)	0.0	15.1	37.0	56.2	63.1	63.1	65.8

表 2 DAS 处理 MGC803 细胞 96 h 内的吸光度值(n=6)

	DAS(mg/L)								
	0	10	20	30	40	50	60	80	100
$\bar{x} \pm s$	0.54	0.52	0.54	0.54	0.54	0.51	0.49	0.48	0.43
	0.053	0.045	0.060	0.067	0.054	0.046	0.041	0.044	0.058
抑制率(%)	0.0	3.7	0.0	0.0	0.0	5.5	9.3	11.1	20.4

表 3 DMSO 处理 MGC803 细胞 96 h 内的吸光度 A<sub>570</sub> 值(n=6)

	DMSO(mL/L)				
	0	10	15	20	25
$\bar{x} \pm s$	0.80	0.73	0.63	0.41	0.34
	0.089	0.061	0.076	0.069	0.036
抑制率 (%)	0.0	11.3	21.3	48.7	57.5

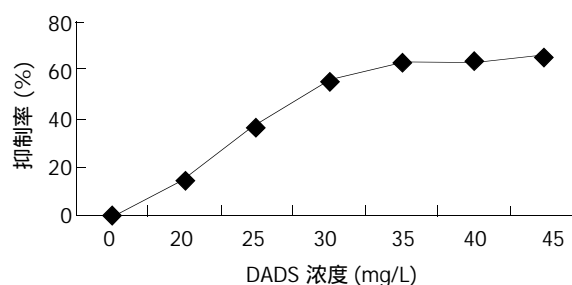


图 1 DADS 对 MGC-803 细胞生长抑制效应。

**2.2 生长曲线及时间-效应曲线** 根据细胞生长曲线(图 2) 绘制 35 mg/L<sup>-1</sup> I, 25 mg/L<sup>-1</sup> 的 DADS, 2.0 % DMSO 及 Tween 80 溶媒对 MGC803 细胞生长抑制作用的时间-效应关系曲线(图 3)。2.0 % DMSO 对 MGC803 细胞生长抑制作用于 72 h 达到高峰(56.95 %)而后下降, 呈现时间-效应依赖关系; DADS 在 35 mg/L<sup>-1</sup> 时, 随培养时间的延长, 细胞生长抑制率随之增加, 72 h 后进入平台期, 呈



现时间-效应依赖关系; DADS在 $25\text{ mg/L}^{-1}$ 时, 随时间的延长, 细胞生长抑制率稍有增加而近成直线, 表明 $25\text{ mg/L}^{-1}$ 的DADS对MGC803细胞生长抑制效应稳定, 与时间无关( $P < 0.05$ ). Tween 80溶媒对MGC803细胞生长抑制作用于第24 h为最大, 而后随时间的延长, 其对MGC803细胞生长抑制效应逐渐降低.

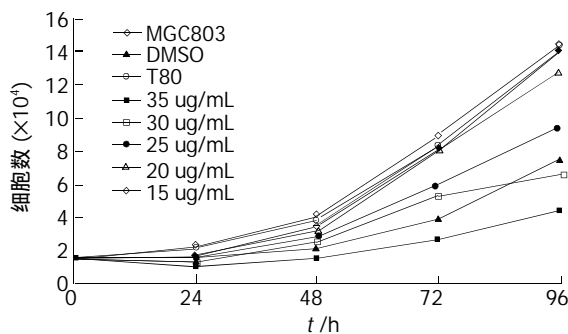


图2 MGC803细胞生长曲线.

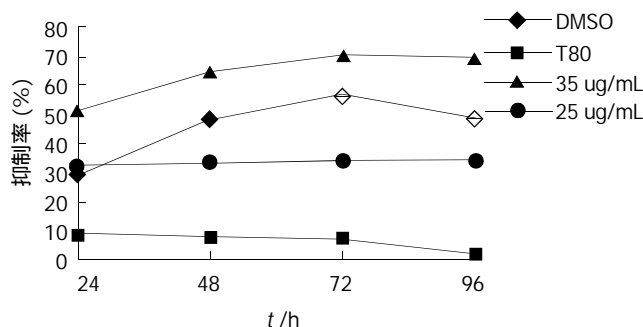


图3 DADS对MGC803细胞抑制作用的时间效应.

2.3 细胞群体倍增时间和活力 常规培养的MGC803细胞群体倍增时间为33.8 h; 当DADS浓度由 $20\text{ mg/L}$ 增加到 $35\text{ mg/L}$ 时, 其细胞群体倍增时间由36.0 h延长到84.0 h, 表明MGC803细胞经DADS作用后, 其细胞群体倍增时间明显延长, 细胞增生周期延长, 从而细胞增生速度减慢.  $20\text{ mL/L}$  DMSO也将MGC803细胞群体倍增时间延长至50.7 h, Tween 80对MGC803细胞群体倍增时间无影响(表4). DADS处理组细胞存活率比常规培养的MGC803对照组有所下降, 但无统计学差异( $P > 0.05$ ); DMSO及Tween 80与常规培养的MGC803对照组间亦无差异性( $P > 0.05$ , 表5).

2.4 集落形成和镜检 经DADS和DMSO处理后的MGC803细胞集落形成能力明显降低. Poisson分布检验表明, 除 $20\text{ mg/L}$  DADS组, DMSO组与对照组细胞集落形成率无差异性( $P > 0.05$ )外,  $25\text{ mg/L}$ ,  $30\text{ mg/L}$ ,  $35\text{ mg/L}$  DADS各组均有显著性差异( $P < 0.05$ , 表6). 未处理组与Tween 80溶媒组的细胞形态呈多角形、圆形, 细胞体积大, 边缘不清, 多形性明显; 胞质较丰富, 饱满而透亮; 核大小不一, 可见核分裂、双核及核仁; 细胞生长紧密甚至呈堆叠生长(图4). DADS与DMSO处理组细胞形态变化明显, 由多角形为主变为形态一致、以梭形为主, 胞质丰富透亮, 可见部分圆形漂浮的细胞, 其胞质

内见许多颗粒; 大部分细胞体积小, 贴壁紧密, 分散存在, 细胞境界清楚; 细胞核明显变小, 未见核分裂(图5).

表4 处理前后MGC803细胞群体平均倍增时间

参数	MGC803	DMSO	T80	DADS(mg/L)			
				20	25	30	35
初种细胞数( $\times 10^4$ )	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
细胞记数( $\times 10^4$ )	14.44	7.46	14.06	12.77	9.48	6.46	4.44
倍增时间(h)	33.75	50.74	34.21	35.99	42.90	56.99	83.96

表5 MGC803细胞存活率改变

参数	MGC803	DMSO	T80	DADS ( $\text{mg/L}^{-1}$ )			
				35	30	25	20
死细胞数	7	10	13	22	38	28	100
活细胞数	261	130	247	117	156	172	559
细胞活力(%)	97.37	92.87	95.00	84.21	80.38	86.00	84.83

表6 软琼脂培养MGC803细胞克隆集落形成率

参数	MGC803	DMSO	T80	DADS(mg/L)			
				20	25	30	35
接种细胞数	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
$\bar{x} \pm s$	12.33	8.67	13.00	10	7.67	4.33	3.33
	1.247	0.471	0.816	0.816	1.699	1.247	1.247
相对集落形成率(%)	70.32	↑ 5.4	81.10	62.21	35.12	27.01	

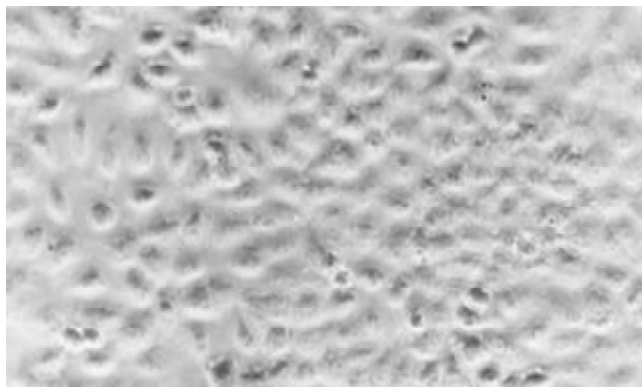


图4 未处理MGC803细胞 $\times 20$ .

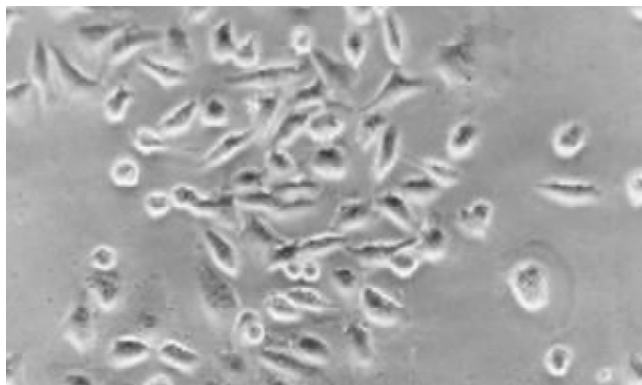


图5 DADS处理后MGC803细胞 $\times 20$ .

### 3 讨论

DADS是大蒜主要有效成分烯丙基硫化物中的一类低分子量非水溶性化合物. 近年来研究表明, DADS对结肠癌、白血病、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤均有明显的抑制作用<sup>[14-17]</sup>. 关于DADS抗癌机制, 目前认为可能与其可明显增加GST、QR、EH等解毒酶的活性<sup>[24, 25]</sup>, 刺激淋巴细胞增生, 增强巨噬细胞吞噬能力, 促进IL-2, TNF- $\alpha$ , IF- $\gamma$ 释放, 提高NK, LAK细胞活性; 阻断细胞周期演进, 使细胞停滞于G2期, 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[14-16]</sup>; 干扰癌细胞信号传导途径, 影响癌基因与抑癌基因的表达有关. 而DADS对人胃癌细胞生长抑制的研究不多. 我们采用MTT法、生长曲线分析、细胞活力检测、双层琼脂集落形成率及倒置显微镜等方法, 观察DADS对体外培养的人胃癌MGC803细胞的影响. MTT比色实验表明, DADS作用MGC803细胞后, DADS浓度由20 mg/L增至45 mg/L时, MGC803细胞的生长抑制率由15.1%提高到65.8%, 呈现浓度-效应依赖关系, 各浓度组之间均有显著性差异( $P < 0.05$ ), DADS对MGC803细胞的 $IC_{50}$ 在25-30 mg/L之间, 且DADS浓度大于35 mg/L时, MGC803细胞的生长抑制率并不随DADS浓度增加而增加. 我们同时对DADS中所含DAS的作用进行了实验, 结果显示DAS浓度在40 mg/L以下时, 其对MGC803细胞生长无影响. 因而可以提示, DADS对MGC803细胞的生长抑制作用仅仅是单体DADS作用的结果. 集落形成率结果显示, 经DADS和DMSO处理后的MGC803细胞集落形成能力明显降低, 除20 mg/L DADS组、20 mL/L DMSO组无差异性外, 25 mg/L, 30 mg/L, 35 mg/L DADS各组与对照组均有显著性差异( $P < 0.05$ ).

细胞过度增生, 分化与凋亡的阻遏是肿瘤的基本特征. 我们发现DADS在一定浓度范围内对MGC803细胞具有良好的生长抑制作用且呈剂量-效应依赖关系; 较高浓度(35 mg/L) DADS对MGC803细胞的生长抑制作用还表现出时间-效应依赖关系, 25 mg/L DADS则作用稳定, 与接触时间无关. MGC803细胞在DADS处理后其细胞群体倍增时间明显延长, 而细胞存活率与阴性对照之间无显著性差异, 表明DADS抑制MGC803细胞生长作用不是直接杀伤细胞而使进入分裂增生的细胞数量减少所致, 这与阳性对照的DMSO结果相一致. 综合形态学观察, DADS处理后MGC803细胞异型性降低, 为形态一致的梭形, 体积小, 胞质丰富, 核明显变小, 提示DADS可能具有诱导MGC803细胞分化的作用.

### 4 参考文献

- 1 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-543
- 2 Zheng ZH, Sun XJ, Qiu GR, Liu YH, Wang MX, Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition early and advanced stages of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:153-156
- 3 Cheng SD, Wu YL, Zhang YP, Qiao MM, Guo QS. Abnormal drug accumulation in multidrug resistant gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:131-134

- 4 Chen GY, Wang DR. The expression and clinical significance of CD44v in human gastric cancers. *World J Gastroenterol* 2000; 6:125-127
- 5 Wang RQ, Fang DC, Liu WW. MUC2 gene expression in gastric cancer and preneoplastic lesion tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:285-288
- 6 Guo YQ, Zhu ZH, Li JF. Flow cytometric analysis of apoptosis and proliferation in gastric cancer and precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:983-987
- 7 Chen SY, Wang JY, Ji Y, Zhang XD, Zhu CW. Effects of *Helicobacter pylori* and protein kinase C on gene mutation in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:302-307
- 8 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 9 Wu K, Zhao Y, Liu BH, Li Y, Liu F, Guo J, Yu WP. RRR- $\alpha$ -tocopheryl succinate inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest. *World J Gastroenterol* 2002;8:26-30
- 10 He XS, Su Q, Chen ZC, He XT, Long ZF, Ling H, Zhang LR. Expression, deletion and mutation of p16 gene in human gastric cancer. *World J Gastroenterology* 2001;7:515-521
- 11 Sun XD, Mu R, Zhou YS, Dai XD, Qiao YL, Zhang SW, Huangfu XM, Sun J, Li LD, Lu FZ. 1990-1992 mortality of stomach cancer in China. *Zhongguo Zhongliu Zazhi* 2002;24:4-8
- 12 Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9:35-39
- 13 Fleischauer AT, Arab L. Garlic and cancer: a critical review of the epidemiologic literature. *J Nutr* 2001;131:1032-1040
- 14 Robert V, Mouille B, Mayeur C, Michaud M, Blachier F. Effects of the garlic compound diallyl disulfide on the metabolism, adherence and cell cycle of HT-29 colon carcinoma cells: evidence of sensitive and resistant sub-populations. *Carcinogenesis* 2001;22: 1155-1161
- 15 Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR, Park BH. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 2002;63:41-47
- 16 Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2001;22:891-897
- 17 Hong YS, Ham YA, Choi JH, Kim J. Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expression of Bcl-2, Bax and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Exp Mol Med* 2000; 32:127-134
- 18 Su Q, Luo ZY, Li YQ, He XE. Inhibitory and reverse effect of garlic on experimental gastric carcinoma and precancerous lesion. *Aizheng* 1996;15:172-174
- 19 Su Q, Luo ZY, Teng H, Ying WD, Li YQ. Effect of garlic on serum contents of Tch, LDL and HDL observed in MNNG-induced experimental gastric carcinoma and precancerous lesion. *Zhongguo Zhongliu Linchuang* 1997;23:130-133
- 20 Su Q, Luo ZY, Teng H, Yun WD, Li YQ, He XE. Effect of garlic and garlic-green tea mixture on serum lipids in MNNG-induced experimental gastric carcinoma and precancerous lesion. *World J Gastroenterol* 1998;4:29
- 21 Su Q, Luo ZY, Ou-Yang G, Li YQ, Zhou JG, Zhang D. Effect of garlic on micronucleus frequency of peripheral blood lymphocytes in MNNG-induced gastric carcinoma and precancerous lesion in rats. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:689-690
- 22 Tan M, Su Q, Ouyang G, Luo ZY, Li YQ. Effect of garlic on lymphocyte function and carcinogenesis in experimental gastric carcinoma. *Shiyong Zhongliu Zazhi* 1997;12:203-204
- 23 Peng J, Su Q, Song Y, Zhang LY, Liang XQ. Effect of growth inhibition of diallyl trisulfide on gastric cancer MGC-803 cell line in vitro. *Zhongguo Yaolixue Tongbao* 2002;18:210-213
- 24 Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Tsai SJ, Lii CK. Effects of organosulfur compounds from garlic oil on the antioxidation system in rat liver and red blood cells. *Food Chem Toxicol* 2001; 39:563-569
- 25 Chen HW, Yang JJ, Tsai CW, Wu JJ, Sheen LY, Ou CC, Lii CK. Dietary fat and garlic oil independently regulate hepatic cytochrome p(450) 2B1 and the placental form of glutathione S-transferase expression in rats. *J Nutr* 2001;131:1438-1443

# 胃黏膜癌变过程中PTEN基因编码产物的表达及意义

李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东瑛, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉

李异玲, 何向民, 傅宝玉, 中国医科大学附属第一医院消化内科  
辽宁省沈阳市 110001  
郑华川, 吴东瑛, 杨雪飞, 辛彦, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所, 第四研究室. 辽宁省沈阳市 110001  
李异玲, 女, 1972-09-29 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 博士生, 讲师, 中国医科大学附属第一医院消化内科.  
国家自然科学基金资助课题, No. 30070845  
项目负责人: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所, 第四研究室. yxin@mail.cmu.edu.cn  
电话: 024-23256666-6351  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-25

## Expression of PTEN encoding product in malignant lesions of gastric mucosa and its significance

Yi-Ling Li, Xiang-Min He, Hua-Chuan Zheng, Dong-Ying Wu  
Xue-Fei Yang, Yan Xin, Bao-Yu Fu

Yi-Ling Li, Xiang-Min He, Bao-Yu Fu, Department of Digestive diseases, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street 155, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Hua-Chuan Zheng, Dong-Ying Wu, Xue-Fei Yang, Yan Xin, Cancer Institute, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street 155, Shenyang 110001, China  
Correspondence to: Dr. Yan Xin, Department of Digestive Disease, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street 155, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yxin@mail.cmu.edu.cn  
Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-25

## Abstract

**AIM:** To observe the expression of PTEN protein in gastric cancer and precancerous lesions, and to investigate the relationship between PTEN expression and the pathogenesis of gastric cancer.

**METHODS:** Normal gastric mucosa, chronic superficial gastritis, atrophic gastritis without intestinal metaplasia, atrophic gastritis with intestinal metaplasia, moderate and severe dysplasia, early and advanced gastric cancer, 60 cases each group, were selected for PTEN protein expression by SP immunohistochemistry.

**RESULTS:** The expression of PTEN encoding product in normal gastric mucosa was 100 %. For chronic superficial gastritis, atrophic gastritis without intestinal metaplasia, atrophic gastritis with intestinal metaplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia, the PTEN protein expression rate was 98.3 %, 91.6 %, 78.3 %, 75 %, 63.3 %, respectively. The expression of PTEN protein in early stage and advanced gastric cancer was 61.7 % and 43.3 % respectively. Among the 120 cases of gastric cancer, 76 cases were intestinal type gastric cancer, the PTEN protein expression was 60.5 %, 44 cases were diffuse gastric cancer, the PTEN protein expression was 38.6 %.

**CONCLUSION:** The expression of PTEN protein is downregulated

in the process of gastric cancer, PTEN protein can be used as a maker to evaluate the biological behaviours of gastric cancer.

Li YL, He XM, Zheng HC, Wu DY, Yang XF, Xin Y, Fu BY. Expression of PTEN encoding product in malignant lesions of gastric mucosa and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1294-1296

## 摘要

**目的:** 观察抑癌基因PTEN编码产物在胃黏膜癌变过程中的表达, 探讨PTEN表达与胃癌发生的关系。

**方法:** 选取胃镜下正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎无肠化、萎缩性胃炎伴肠化、中度不典型增生、重度不典型增生标本各 60 例, 选取手术后早期胃癌、进展期胃癌标本各 60 例, 应用 S-P 免疫组化方法检测各种胃黏膜病变中PTEN编码产物表达, 比较其表达与胃癌发生的关系。

**结果:** PTEN编码产物在正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、无肠化萎缩性胃炎、伴肠化萎缩性胃炎、中度异型增生、重度异型增生、早期胃癌和进展期胃癌中的阳性表达率分别为 100 %, 98.3 %, 91.6 %, 78.3 %, 75 %, 63.3 %, 61.7 %, 43.3 %。在检测的 120 例胃癌中, 肠型胃癌 76 例, PTEN表达率为 60.5 %, 弥漫型胃癌 44 例, PTEN表达率为 38.6 %。

**结论:** PTEN基因编码蛋白在胃癌发生过程中进行性下调, PTEN蛋白表达可作为判定胃癌生物学行为的客观指标。

李异玲, 何向民, 郑华川, 吴东瑛, 杨雪飞, 辛彦, 傅宝玉. 胃黏膜癌变过程中PTEN基因编码产物的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1294-1296  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1294.asp>

## 0 引言

PTEN/MMAC<sub>1</sub>/TEP<sub>1</sub> (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten/mutated in multiple advanced cancers/TGF- $\beta$ -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) 是一个新的肿瘤抑制基因<sup>[1,2]</sup>. PTEN基因异常在肿瘤的发生发展过程中起重要作用<sup>[3-5]</sup>, 与胃癌的浸润和转移有关<sup>[6,7]</sup>, 我们研究PTEN编码产物与胃癌癌前期病变的关系如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2001-2002 年胃镜中心活检, 正常胃黏膜, 慢性萎缩性胃炎不伴肠化, 慢性萎缩性胃炎伴肠化,



中度不典型增生, 重度不典型增生病例各 60 例, 年龄 29-74 (平均 55 岁); 肿瘤科术后大体标本, 早期胃癌及进展期胃癌各 60 例, 术前未化放疗, 年龄 36-68 (平均 54 岁). 经 HE 染色, 病理医生诊断. PTEN mAb (浓缩液) 和 S-P 试剂盒购自福州迈新公司.

1.2 方法 标本经甲醛固定, 石蜡包埋, 5  $\mu$ m 连续切片用于 S-P 免疫组织化学染色. PTEN 染色定位在细胞质内. 由两位观察者随机选择 5 个有代表性的视野计数 100 个细胞来确定 PTEN 的染色强度. PTEN 在组织中的表达强度分级如下: 阳性细胞小于或等于 5 % 为阴性(-); 5-25 % 为弱阳性(+); 25-50 % 为阳性(++); 大于 50 % 为强阳性(+++).

统计学处理 采用  $\chi^2$  检验比较各组间比率的差异, 应用 Spearman 分析等级资料.  $P < 0.05$  为差异具有显著意义, 所有数据均利用 SPSS10.0 统计学软件处理.

## 2 结果

PTEN 蛋白在正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎不伴肠化、萎缩性胃炎伴肠化、中度异型增生、重度异型增生、早期胃癌和进展期胃癌的阳性表达率分别为 100.0 % (60/60), 98.3 % (59/60), 91.6 % (55/60), 78.3 % (47/60), 75.0 % (45/60), 63.3 % (38/60), 61.7 % (37/60), 43.3 % (26/60). 所检测的 120 例胃癌中, 肠型胃癌 76 例, PTEN 表达率为 60.5 %, 弥漫型胃癌 44 例, PTEN 表达率为 38.6 %. (图 1-6).

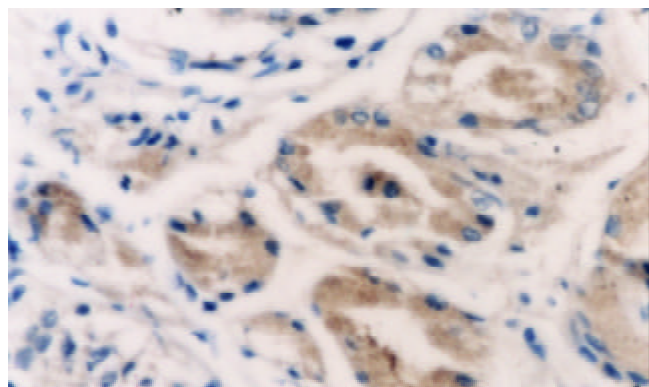


图 1 萎缩性胃炎无肠化 PTEN 阳性表达  $\times 40$ .

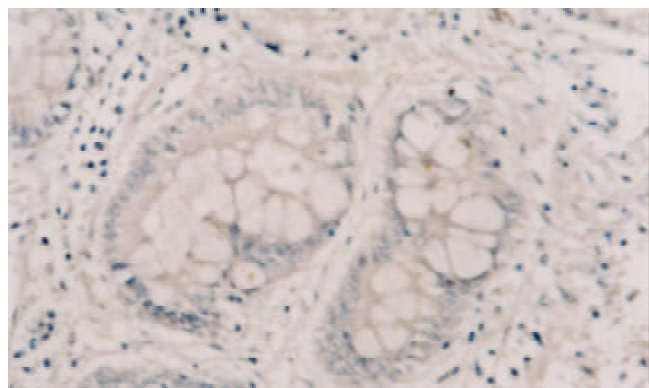


图 2 萎缩性胃炎伴肠化 PTEN 表达降低  $\times 20$ .

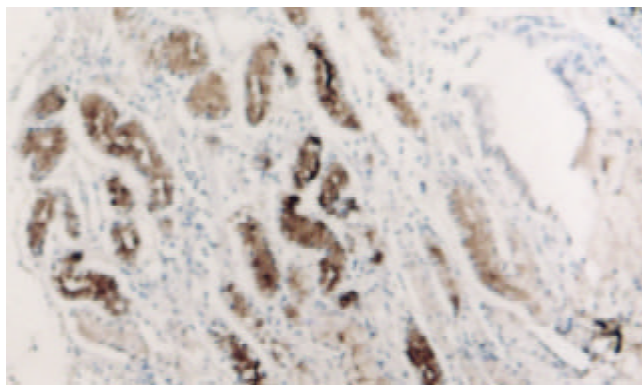


图 3 中度不典型增生 PTEN 表达降低  $\times 20$ .

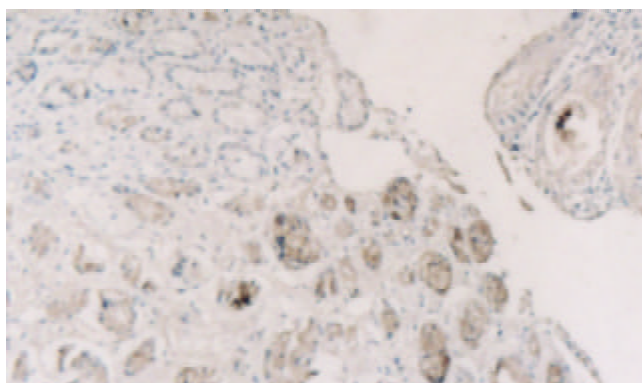


图 4 重度不典型增生 PTEN 表达降低  $\times 20$ .

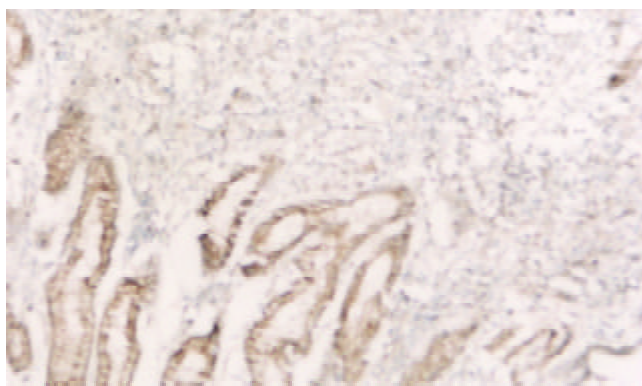


图 5 早期胃癌 PTEN 表达降低(左下阳性表达处为正常黏膜)  $\times 20$ .

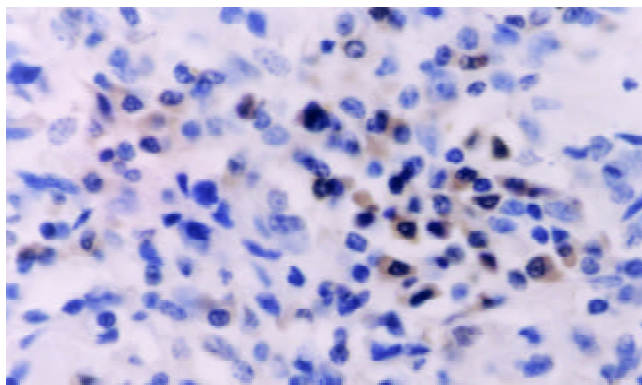


图 6 弥漫性胃癌 PTEN 表达降低  $\times 40$ .

## 3 讨论

PTEN 在各种癌中总的突变率为 5-40 %, 其间的差异

可能由于组织学类型和临床分期的不同<sup>[8-16]</sup>, 目前认为在具有遗传倾向的结直肠肿瘤如青少年多发性息肉病中发病率较高, 而在散发性结直肠癌中发病率较低<sup>[17-19]</sup>. 胃癌是常见的消化道肿瘤, 在胃癌的发生中, 从正常胃黏膜上皮转化成癌是一个多步骤的过程, 他是由于多种基因异常在多年的阶段中积累的结果, 其中涉及到多种癌基因, 抑癌基因, 端粒及端粒酶, 细胞黏附因子及DNA 错配修复基因的异常和积累<sup>[20-34]</sup>, 本结果表明, 在从慢性胃炎 - 萎缩性胃炎 - 肠上皮化生 - 异型性增生 - 癌变的过程中, PTEN 的阳性表达率逐渐降低, 缺失率逐渐升高. PTEN蛋白在正常胃黏膜中为100%表达, 在慢性浅表性胃炎中的表达率为98.3%, 与正常胃黏膜相比, 无显著差异( $\chi^2=0.000$ ,  $P=1.000$ ). 在无肠化的萎缩性胃炎中的表达率为91.6%, 而在伴有肠化的萎缩性胃炎中表达率为78.3%, 二者之间差异显著( $\chi^2=4.183$ ,  $P=0.041$ ), 而无肠化的萎缩性胃炎与慢性浅表性胃炎相比, 二者间无显著差异( $\chi^2=2.807$ ,  $P=0.094$ ), 说明抑癌基因PTEN对于增生性萎缩性胃炎向恶性转化过程中起重要作用. 不典型增生组PTEN缺失率较萎缩性胃炎伴肠化高, 且有显著差异( $\chi^2=4.076$ ,  $P=0.042$ ), 但对于中度、重度不典型增生, PTEN缺失频率之间无显著差异( $\chi^2=1.915$ ,  $P=0.166$ ), 但Spearman 分析结果显示表达强度有差异, 说明随着增生程度的增加, 抑癌基因的缺失也越来越明显. 在从不典型增生向癌的发生过程中, PTEN 呈持续性缺失, PTEN 在弥漫性胃癌的缺失率较肠型胃癌高, 其间有显著差异( $\chi^2=5.355$ ,  $P=0.021$ ), 说明随着肿瘤恶性程度的增加, PTEN 的缺失率增高.

总之, 我们认为抑癌基因PTEN蛋白在胃癌的发生过程中进行性下调, 其缺失在癌前期病变萎缩性胃炎伴肠化阶段就开始出现, 一直持续到进展期胃癌, 并且随着恶性程度的增加, PTEN 蛋白缺失率增高, 其机制可能与抑制细胞生长、迁移、铺展和局部黏附, 促进血管形成等有关, 但对于PTEN 蛋白表达为野生型还是野生型? 这种缺失发生于转录前还是转录后, 还需要通过分子生物学的研究来进一步明确.

#### 4 参考文献

- Kim S, Domon-Dell C, Wang Q, Chung DH, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Freund JN, Evers BM. PTEN and TNF- $\alpha$  regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF- $\kappa$ B-dependent pathway. *Gastroenterology* 2002;123:1163-1178
- McConnachie G, Pass I, Walker SM, Downes CP. Interfacial kinetic analysis of the tumor suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem J* 2003;371(pt 3):947-955
- Wishart MJ, Dixon JE. PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten. *Trends Cell Biol* 2002;12:579-585
- Martini M, Ciccarone M, Garganese G, Maggiore C, Evangelista A, Rhimi S, Zannoni G, Vittori G, Larocca LM. Possible involvement of hMLH1, p16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int J Cancer* 2002;102:398-406

- Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguie F, Mayeux P, Dreyfus F, Lacombe C, Bouscary D. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002;21:6587-97
- Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:35-39
- Zheng HC, Chen Y, Kuang LG, Yang L, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. Expression of PTEN-encoding product in different stages of carcinogenesis and progression of gastric carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003;25:13-16
- Amant F, de la Rey M, Dorflin CM, van der Walt L, Dreyer G, Dreyer L, Vergote I, Lindeque BG, Van Rensburg EJ. PTEN mutations in uterine sarcomas. *Gynecol Oncol* 2002;85:165-169
- Koul D, Shen R, Garyali A, Ke LD, Liu TJ, Yung WK. MMAC/PTEN tumor suppressor gene regulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in prostate cancer. *Int J Oncol* 2002;21:469-475
- Ding X, Endo S, Zhang SJ, Saito T, Kouno M, Kuroiwa T, Washiyama K, Kumanishi T. Primary malignant lymphoma of the brain: analysis MMAC1(PTEN) tumor suppressor gene. *Brain Tumor Pathol* 2001;18:139-143
- An Q, Liu Y, Gao Y, Huang J, Fong X, Liu L, Zhang D, Zhang J, Cheng S. Deletion of tumor suppressor genes in Chinese non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2002;184:189-195
- Eng C. Role of PTEN, a lipid phosphatase upstream effector of protein kinase B, in epithelial thyroid carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2002;968:213-221
- Mavros A, Hahn M, Wieland I, Koy S, Koufaki ON, Strelocke K, Koch R, Haroske G, Schackert HK, Eckelt U. Infrequent genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2002;31:270-276
- Fujii H, Matsumoto T, Yoshida M, Furugen Y, Takagaki T, Iwabuchi K, Nakata Y, Takagi Y, Moriya T, Ohtsuiji N, Ohtsuiji M, Hirose S, Shirai T. Genetics of synchronous uterine and ovarian endometrioid carcinoma: combined analyses of loss of heterozygosity PTEN mutation, and microsatellite instability. *Hum Pathol* 2002;33:421-428
- Cheng LM, Wang SY, Lin JS. Expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) and p53 protein and their significance in human hepatocellular carcinomas. *Ai Zheng* 2003;22:42-45
- Guo SP, Zhai YQ, Wang WL, Ma FC. Expression and significance of a new tumor suppression gene PTEN in primary renal cell carcinoma. *Ai Zheng* 2002;21:582-587
- Huang SC, Chen CR, Lavine JE, Taylor SF, Newbury RO, Pham TT, Ricciardiello L, Carethers JM. Genetic heterogeneity in familial juvenile polyposis. *Cancer Res* 2000;60:6882-6885
- Negoro K, Takahashi S, Kinouchi Y, Takagi S, Hiwatashi N, Ichinohasama R, Shinosegawa T, Toyota T. Analysis of the PTEN gene mutation in polyposis syndromes and sporadic gastrointestinal tumors in Japanese patients. *Dis Colon Rectum* 2000;43:S29-33
- Guanti G, Resta N, Simone C, Cariola F, Demma I, Fiorente P, Gentile M. Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis. *Hum Mol Genet* 2000;9:283-287
- Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- Fang DC, Yang SM, Zhou XD, Wang DX, Luo YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:522-526
- Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- Su JM, Gui L, Zhou YP, Zha XL. Expression of focal adhesion kinase and  $\alpha$ 5 and  $\beta$ 1 integrins in carcinomas and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:613-618

# 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系

黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识

黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识, 中国人民解放军总医院老年消化科北京市 100853

黄海力, 男, 1973-09-15 生, 江西省南昌市人, 汉族, 1996 年第二军医大学临床医学本科毕业, 现为解放军总医院老年消化科博士研究生, 主要从事胃癌诊治研究, 发表论 2 篇。

军队“十五”重点科研基金资助课题, No. 01Z035

项目负责人: 吴本俨, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军解放军总医院老年消化科。 hailiuhuang301@hotmail.com

电话: 010-66937393

收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

## Prognostic factors and pathology of advanced gastric cancer

Hai-Li Huang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Ming-Shi Shen

Hai-Li Huang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Ming-Shi Shen, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China Supported by Key Project Grant in Medical Sciences funding the Tenth Five-Year Plan of Chinese PLA, No. 01Z035

Correspondence to: Dr. Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. hailiuhuang301@hotmail.com

Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-08

## Abstract

AIM: To investigate the prognostic factors and the relationship between clinicopathologic parameters and biological properties in advanced gastric cancer.

METHODS: In tumor samples from 61 primary advanced gastric cancer patients with curative resection, following parameters of sex, age, tumor size, grade of differentiation, depth of invasion, lymph node metastasis, lymphatics invasion and TNM stage were evaluated. In addition, DCs infiltration, PCNA-LI and AI were examined by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling) or immunohistochemical methods. The prognostic impact of these parameters was analyzed by univariate and multivariate survival analysis.

RESULTS: PCNA-LI, AI and DCs infiltration were significantly correlated to lymph node metastasis, TNM stage and differentiation grade. Univariate Kaplan-Meier analysis showed that depth of invasion, lymph node metastasis, TNM stage, PCNA-LI and infiltration of DCs had prognostic significances for survival (Log-rank test,  $P < 0.05$ ), while multivariate Cox analysis indicated that only tumor size (RR=2.328) and TNM stage (RR =5.251) were independent prognostic factors for survival.

CONCLUSION: In advanced gastric cancer, UICC TNM stage and tumor size are independent prognostic factors, and infiltration of DCs and proliferation of cancer cells play a role in the prognostic outcome.

Huang HL, Wu BY, You WD, Shen MS. Prognostic factors and pathology of advanced gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9): 1297-1301

## 摘要

目的: 研究机体免疫因素和肿瘤生物学行为与进展期胃癌病理之间的相关性, 比较并筛选对进展期胃癌预后影响的指标。

方法: 获得 61 例行根治性切除术的进展期胃癌预后资料, 用免疫组化(SABC法)和TUNEL (原位末端标记)方法检测组织切片中胃癌细胞增生细胞核抗原标记指数(PCNA-LI)、树突状细胞(DCs, dendritic cells)浸润密度, 凋亡指数(AI, apoptosis index), 研究上述指标和病理之间的相关性并进行单因素、多因素生存分析。

结果: PCNA-LI, DCs, AI 与 TNM 分期、淋巴结转移、淋巴管浸润、胃癌分化有相关性。单因素生存分析表明胃癌患者的年龄、性别、病灶的大小、肿瘤分化、是否有淋巴管癌栓、AI 等与胃癌预后无关。胃癌分期、浸润深度、淋巴结转移、PCNA-LI、DCs 浸润密度是胃癌预后的影响因素(Log-rank test,  $P < 0.05$ )。多参数回归生存分析表明肿瘤大小(RR=2.328), UICC (1997 年)TNM 分期(RR=5.251)是胃癌预后的独立影响因素( $P < 0.05$ )。

结论: UICC 的胃癌 TNM 分期是判断胃癌预后有价值的指标。胃癌细胞本身生物学特性和机体的免疫状态与胃癌病理有一定相关性并且参与了对胃癌预后的影响。

黄海力, 吴本俨, 尤纬缔, 申明识. 进展期胃癌病理和预后影响因素的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1297-1301

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1297.asp>

## 0 引言

胃癌的恶性程度、病理特点、预后以及对治疗的不同反应与肿瘤的生物学特性和机体的免疫状态有关<sup>[1-3]</sup>。肿瘤的增生、凋亡是肿瘤生物学特性的主要指标<sup>[4]</sup>, 肿瘤局部浸润的树突状细胞数量和功能反映了机体抗肿瘤的免疫状况<sup>[5]</sup>。我们随访获得了进展期胃癌根治术后患者 61 例生存资料, 用免疫组化和原位凋亡技术检测了手术切除组织切片中的 DCs 浸润和胃癌细胞的增生和凋亡, 分析他们对预后的影响。

## 1 材料和方法

1.1 材料 1994/2001 年在我院行根治性胃大部切除或胃全切的进展期胃癌随访获得 61 例患者, 术前没有经过放化疗以及免疫治疗, 影像学检查和手术探查未发现

有远隔脏器转移,手术切除标本残端以及切缘均未见有残留癌细胞.男47例,女14例,年龄27-85(平均59)岁,随访时间1994/05/03-2002/05/01(平均37 mo),其中死亡30例.SABC试剂盒购自武汉博士德公司,S-100兔抗牛多克隆抗体及PCNA鼠抗人单克隆抗体PC-10为北京中山公司产品.

1.2 方法 所有组织切片经过病理科医师复核确认,不包含坏死区域,能够反映肿瘤浸润的最深部位.病理诊断均为胃腺癌,肿瘤的分期和分级依据UICC(1997年)标准.免疫组织化学采用4  $\mu$ m厚的连续石蜡切片,SABC法染色按照试剂盒说明书操作,以TBS代替一抗作为阴性对照.TUNEL法检测胃癌细胞原位凋亡采用德国(boehringer mannheim)公司TUNEL试剂盒,按照试剂盒说明书操作.用TBS代替TUNEL反应液作为阴性对照,阳性对照片经DnaseI预处理30 min后按照试剂盒操作.PCNA阳性细胞细胞核染成颗粒样或片状棕黄色,400  $\times$ 镜下随机观察5个能代表总体染色情况的阳性信号相对密集区域,计数1000个癌细胞中PCNA阳性细胞所占比例,PCNA-LI=PCNA阳性细胞数/1000  $\times$  100%.DCs细胞为S-100阳性,细胞核和细胞质均为黄染,400  $\times$ 镜下随机计数5个视野中S-100阳性细胞总数/5,用DCs数/HP表示DCs浸润密度.细胞核呈黄色深染或者有明显凋亡形态学改变的为凋亡胃癌细胞,400  $\times$ 镜下随机选择10个视野,避开坏死区域,计数1000个胃癌细胞,其中凋亡细胞所占比例即AI=凋亡细胞数/1000  $\times$  100%.

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件包.各组PCNA-LI, AI, DCs浸润程度用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,上述指标的组间差异进行t检验和单因素方差分析(F检验);频数比较用 $\chi^2$ 检验.单因素生存分析采用Kaplan-Meier方法,Log-rank检验生存率的显著性差异.多因素生存分析采用Cox比例风险模型.上述统计结果判断:  $P < 0.05$  为差异有显著性.

## 2 结果

2.1 临床病理和DCs浸润、PCNA-LI, AI之间的相关性 PCNA-LI平均数为52.4 $\pm$ 13.4%, AI均数为3.3 $\pm$ 1.4%, DCs浸润平均密度为7.2 $\pm$ 5.4个/HP(图1-5).进展期胃癌患者性别、年龄、肿瘤的部位、大小、浸润深度与DCs浸润, PCNA-LI, AI均无相关.而TNM分期,淋巴结转移,淋巴管浸润,胃癌分化与DCs, PCNA-LI, AI有相关性(表1).有无淋巴结转移组DCs浸润密度分别为5.5 $\pm$ 4.4/HP和8.51 $\pm$ 5.57/HP,两组差异有显著性( $P = 0.03$ );随肿瘤分期的进展,DCs浸润有逐渐减少的趋势,I, II, III期胃癌中DCs浸润数量分别为11.2 $\pm$ 6.1/HP, 6.3 $\pm$ 4.4/HP和5.5 $\pm$ 5.2/HP,单因素方差分析表明I期胃癌与II, III期间有统计学差异( $P = 0.04$ ).进一步以DC浸润均值7.2/HP为界分为高低DC浸润组, $\chi^2$ 检验提示两组间I, II, III期胃癌构成比例分别为10/11/4和4/21/11,差异有显

著性( $P = 0.036$ ).有淋巴结转移组PCNA-LI为57.9 $\pm$ 11.7%,高于无淋巴结转移组49.6 $\pm$ 13.5% ( $P = 0.015$ ),有无淋巴管癌栓组PCNA-LI分别62.0 $\pm$ 12.9%, 51.8 $\pm$ 13.1%,二者差别有统计学意义( $P = 0.034$ ).II, III期胃癌PCNA-LI高于I期胃癌,单因素方差分析显示组间差异有显著性( $P = 0.006$ ).进一步以PCNA-LI均值50%为界分为高低PCNA-LI组,两组淋巴结转移率分别为55.6%和28.0%, $\chi^2$ 检验差异有显著性( $P = 0.033$ ).胃癌凋亡仅与细胞分化有关,低、中、高分化胃癌AI分别为2.2 $\pm$ 0.7%, 3.4 $\pm$ 1.1%, 3.5 $\pm$ 1.3%,单因素方差分析表明低分化胃癌AI低于中、高分化胃癌( $P = 0.048$ ).

表1 进展期胃癌临床病理和DCs浸润,细胞增生和凋亡( $\bar{x} \pm s$ )的相关性

变量	<i>n</i>	DCs/HP	PCNA-LI/ %	AI/ %
男	47	7.1 $\pm$ 5.5	51.9 $\pm$ 13.7	3.3 $\pm$ 1.2
女	14	7.6 $\pm$ 4.9	57.7 $\pm$ 11.9	3.4 $\pm$ 1.3
年龄 小于60岁	25	8.7 $\pm$ 5.8	50.9 $\pm$ 12.2	3.5 $\pm$ 1.2
大于或等于60岁	36	6.1 $\pm$ 4.9	54.9 $\pm$ 14.2	3.2 $\pm$ 1.2
部位 贲门和胃底	27	5.7 $\pm$ 4.4	52.3 $\pm$ 14.7	3.2 $\pm$ 1.2
胃体	10	6.9 $\pm$ 5.6	56.5 $\pm$ 14.6	3.2 $\pm$ 0.7
胃窦或幽门	24	9.0 $\pm$ 5.9	53.1 $\pm$ 11.8	3.6 $\pm$ 1.4
直径 小于5 cm	37	7.4 $\pm$ 5.5	53.7 $\pm$ 14.2	3.3 $\pm$ 1.1
大于或等于5 cm	24	6.8 $\pm$ 5.2	52.7 $\pm$ 12.4	3.3 $\pm$ 1.4
浸润 肌层	26	8.7 $\pm$ 5.9	49.7 $\pm$ 12.8	3.1 $\pm$ 1.4
浆膜层	35	6.1 $\pm$ 4.7	55.9 $\pm$ 13.4	3.5 $\pm$ 1.1
分化 低分化	34	6.7 $\pm$ 4.9	54.8 $\pm$ 14.2	2.2 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
中分化	21	8.4 $\pm$ 5.8	51.9 $\pm$ 12.9	3.4 $\pm$ 1.1
高分化	6	6.2 $\pm$ 6.8	49.6 $\pm$ 11.3	3.5 $\pm$ 1.3
淋巴结转移 无	34	8.5 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>	49.6 $\pm$ 13.5 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 1.3
有	27	5.5 $\pm$ 4.4	57.9 $\pm$ 11.7	2.9 $\pm$ 1.1
淋巴管癌栓 无	52	7.7 $\pm$ 5.5	51.8 $\pm$ 13.1 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 1.2
有	9	4.3 $\pm$ 4.1	62.0 $\pm$ 12.9	2.9 $\pm$ 1.1
分期 I	14	11.2 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>	44.1 $\pm$ 10.6 <sup>b</sup>	3.6 $\pm$ 1.5
II	32	6.3 $\pm$ 4.4	54.4 $\pm$ 13.7	3.1 $\pm$ 1.2
III	15	5.5 $\pm$ 5.2	59.4 $\pm$ 11.2	3.3 $\pm$ 0.9

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 组间.

2.2 影响根治术后进展期胃癌预后的因素 Kaplan-Meier单因素生存分析并用Log-rank检验生存率差异,与胃癌预后相关的因素有肿瘤TNM分期、浸润深度、淋巴结是否转移、PCNA-LI、DCs浸润密度,各组3 a生存率与中位生存时间如表2所示,仅肌层浸润的胃癌预后好于浸润至浆膜层者( $P = 0.0145$ ),无淋巴结转移的胃癌预后好于有淋巴结转移者( $P = 0.0001$ ),TNM分期越晚预后越差( $P = 0.0000$ ),胃癌细胞增生指数越高则预后越差( $P = 0.017$ ),DCs浸润密度高者预后好于DCs浸润低者( $P = 0.03$ ),而患者的性别、年龄、肿瘤部位、分化程度、肿瘤大小、是否有淋巴管癌栓等因素与胃癌预后无关.对胃癌临床病理、胃癌细胞增生、凋亡以及DCs浸润等多项指标进行Cox逐步回归



分析. 仅有 UICC TNM 分期和肿瘤的大小是胃癌预后的独立影响因子. 其相对危险度均大于 2, 说明随肿瘤直径的增大和肿瘤分期的进展预后越来越差(表3). 而肿瘤浸润深度, 淋巴结转移, PCNA-LI, DCs 浸润密度只能作为预后影响相关因子, 而不是独立预后影响因子.

表 2 进展期胃癌预后有关因素

变量	3 a 生存率 $\bar{x} \pm s / \%$	中位生存时间(d)	$\chi^2$ 值	P 值
浸润 肌层	68.5±10.0	2 250	5.98	0.0 145
浆膜层	54.2±9.0 <sup>a</sup>	1 170 <sup>a</sup>		
淋巴结转移无	86.4±6.4	1 620	16.19	0.0 001
有	28.5±9.2 <sup>b</sup>	690 <sup>b</sup>		
分期 I	90.0±9.5	缺	27.16	0.0 000
II	70.7±8.31	590		
III	17.8±10.5 <sup>b</sup>	540 <sup>b</sup>		
PCNA-LI 高	49.8±8.8	930	5.69	0.0 170
低	76.5±9.4 <sup>a</sup>	1 800 <sup>a</sup>		
DCs 浸润 高	70.4±9.5	1 800	4.71	0.0 300
低	53.3±8.9 <sup>a</sup>	1 170 <sup>a</sup>		

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 组间.

表 3 影响胃癌预后的多因素生存分析

指标	回归系数(β)	β 标准误	$\chi^2$ 值	P 值	相对危险度(RR)	95 %CI
肿瘤大小	0.854	0.391	4.670	0.031	2.328	1.082-5.009
TNM 分期	1.658	0.359	21.369	0.000	5.251	2.599-10.608

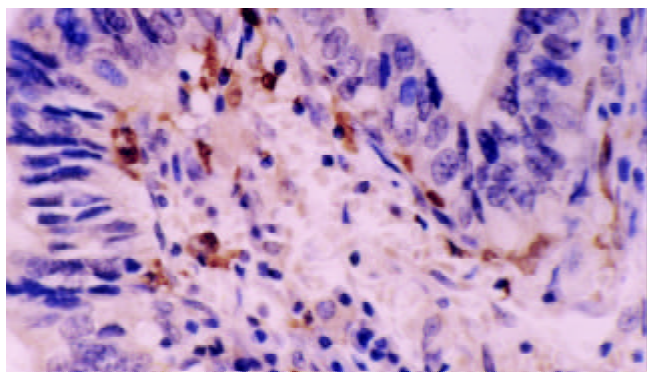


图 1 胃癌组织高 DC 浸润, DC 胞核胞质呈 S-100 阳性染色, 细胞形状不规则在肿瘤间质散在浸润, SABC 法(× 400).

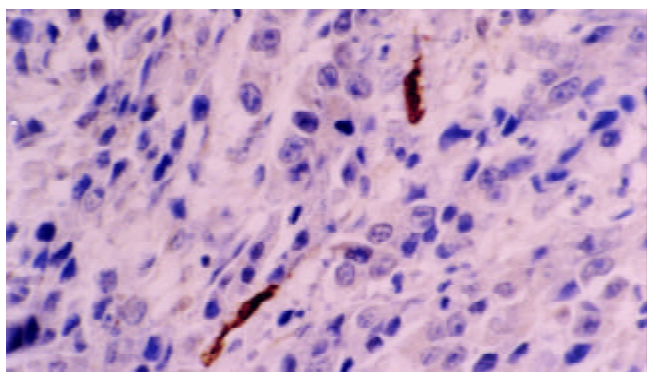


图 2 胃癌组织低 DC 浸润 SABC 法(× 400).

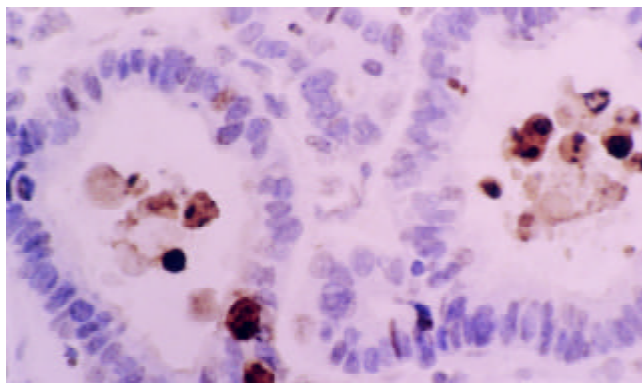


图 3 高分化胃癌组织中凋亡细胞数量较多, 细胞脱落于腺腔中, 有胞质浓缩、胞核固缩, 凋亡小体等典型凋亡形态学改变 TUNEL 法 DAB 显色(× 400).

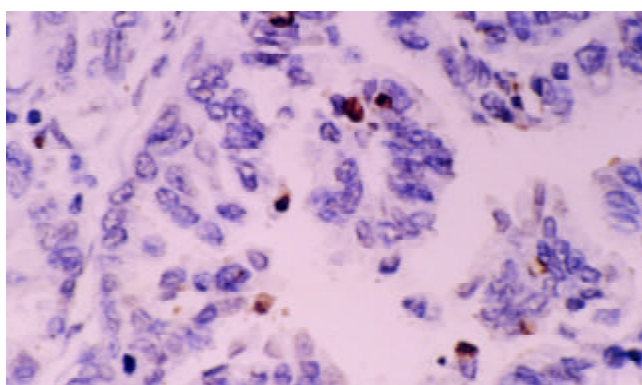


图 4 低分化胃癌组织中凋亡细胞数量少 TUNEL 法 DAB 显色(× 400).

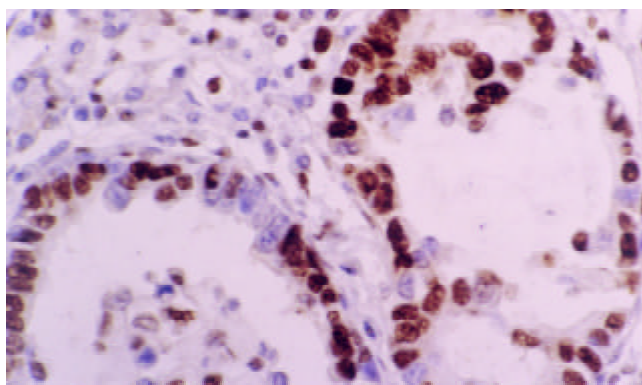


图 5 胃癌组织中 PCNA 染色, PCNA 阳性信号位于细胞核 SABC 法(× 400).

### 3 讨论

以往胃癌生物学行为和预后研究的结论不很一致. 我们尽可能排除了放化疗, 免疫治疗, 以及残留肿瘤的影响, 从 400 例行根治性切除的进展期胃癌患者中严格选出有预后资料的 61 例, 免疫组化显示有淋巴结转移, 淋巴管浸润, TNM 分期晚的肿瘤其 PCNA-LI 越高, PCNA-LI 高的胃癌淋巴结转移率高, 与以往研究结论相同<sup>[6-8]</sup>, 转移灶中肿瘤细胞的 PCNA-LI 显著高于原发灶, 浸润至肌层和浆膜层的肿瘤细胞 PCNA-LI 高于仅浸润至黏膜层和黏膜下层. 上述研究说明增殖活性越高的胃癌细胞侵袭能力越强, 胃癌的进展也越快, 另一方面也提示胃癌越是晚期, 其增生能力越强. 由于

增生活性高的肿瘤其分泌的 VEGF, MMP, EGF, 黏附分子等肿瘤侵袭性因子的能力越强, 这从分子水平解释了 PCNA-LI 与肿瘤恶性度之间的内在联系<sup>[9, 10]</sup>.

凋亡又称程序性细胞死亡, 1972 年首先由英国生物学家 Kerr et al<sup>[11]</sup> 提出. 他是机体普遍存在的生理现象. 1992 年 Gavrieli et al<sup>[12]</sup> 根据凋亡发生的原理, 研究出原位凋亡检测方法, 简称为 TUNEL. 该方法敏感性和特异性高, 与 DNA 梯带电泳(DNA ladder), 电镜、流式细胞染色以及组织 HE 染色目测有很好的相关性<sup>[13]</sup>. 与正常组织相比, 肿瘤细胞抗凋亡能力增强<sup>[14]</sup>. 部分肿瘤中, 肿瘤细胞的凋亡比例能够反映肿瘤的恶性程度和预后<sup>[15, 16]</sup>. 但是, 胃癌中凋亡的意义目前还不明确. 多数研究认为: 胃癌细胞凋亡与增生程度相关, 增生明显的部位凋亡细胞越多<sup>[17-20]</sup>. 但是, 凋亡与胃癌浸润深度, 淋巴结转移, 肿瘤分期, 分化以及预后相关性的研究结论不一致<sup>[19-22]</sup>. 本研究中凋亡仅与胃癌分化有关, 分化越低的胃癌细胞凋亡越少, 提示分化差的胃癌对细胞凋亡可能存在某些逃避机制<sup>[23, 24]</sup>. 由于凋亡受到细胞增生状态, 机体免疫状态, 肿瘤周边环境等多种因素的影响, 因此, 需要大样本研究来评价凋亡在胃癌中的生物学意义.

树突状细胞是机体抗肿瘤免疫中关键的抗原呈呈细胞, 其作用越来越引起重视<sup>[5, 25]</sup>. DCs 本身及其介导的特异性免疫反应对肿瘤细胞有抑制和杀伤作用<sup>[26-30]</sup>, 而肿瘤细胞可以分泌 VEGF, MMP, EGF 等一系列细胞因子抑制 DCs 的成熟和迁移<sup>[25, 31, 32]</sup>, 因此肿瘤组织局部 DCs 浸润数量是肿瘤和机体相互作用的综合反映. 我们研究表明有淋巴结转移以及分期晚的胃癌 DCs 浸润少于无淋巴结转移和分期较早的胃癌, 高 DC 浸润组中早期胃癌比例高而晚期胃癌比例低, 与前人研究结论相同<sup>[33, 34]</sup>. 一方面说明晚期胃癌存在对机体免疫抑制作用, 另一方面也提示高 DC 浸润在一定程度上有抑制胃癌进展的作用.

我们单因素生存分析表明胃癌的预后有关的因素有: PCNA-LI, DC 浸润, 浸润深度, 淋巴结转移和 TNM 分期, 与以往研究的结论相符<sup>[6, 8, 33, 34]</sup>. 此外, 胃癌患者中位生存时间比贲门癌长, 但是, 可能是病例数的限制, 未发现统计学差异. 进一步多因素生存分析表明 TNM 和肿瘤的大小是胃癌独立预后影响因素, 本研究中 DC, PCNA-LI 和 TNM 分期均具有相关性, 说明 TNM 分期能够综合反映胃癌的生物学特性和机体免疫的影响, 因此 TNM 是迄今判断胃癌预后最有价值的指标<sup>[35-37]</sup>. 部分研究认为 DC, PCNA-LI 是独立预后影响因素, 但目前结论不一致. 我们的多参数生存分析表明他们不是独立预后影响因素, 可能与样本数量较少有关, 要得出确切结论需要大样本研究.

总之, 肿瘤的生物学特性, 机体的免疫状态等诸多因素是造成胃癌个体差异和不同预后的内在因素, 对他们之间的相关性进行分析和检测有助于筛选出有

价值的预后指标, 认识胃癌的个体差异, 为胃癌诊断、治疗提供新的途径.

#### 4 参考文献

- Baba H, Korenaga D, Kakeji Y, Haraguchi M, Okamura T, Maehara Y. DNA ploidy and its clinical implications in gastric cancer. *Surgery* 2002;131(Suppl 1):63-70
- Fiocca R, Luinetti O, Villani L, Mastracci L, Quilici P, Grillo F, Ranzani GN. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of gastric carcinoma interactions between genetic alterations, cellular phenotype and cancer histotype. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1523-1530
- Becker KF, Keller G, Hoefler H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol* 2000;9:5-11
- Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001;411:342-348
- Steinman RM, Dhodapkar M. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer* 2001;94:459-473
- Sendler A, Gilbertz KP, Becker I, Mueller J, Berger U, Fink U, van Beuningen D, Siewert JR. Proliferation kinetics and prognosis in gastric cancer after resection. *Eur J Cancer* 2001;37:1635-1641
- 申兴斌, 赵晓明, 胡建功, 金小平, 王军. 胃癌组织中细胞凋亡及 PCNA 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1050-1052
- Konno S, Takebayashi Y, Aiba M, Akiyama S, Ogawa K. Clinicopathological and prognostic significance of thymidine phosphorylase and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *Cancer Lett* 2001;166:103-111
- Werner M, Becker KF, Keller G, Hoefler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:207-216
- Koide N, Nishio A, Kono T, Yazawa K, Igarashi J, Watanabe H, Nimura Y, Hanazaki K, Adachi W, Amano J. Histochemical study of vascular endothelial growth factor in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* 1999;46:952-958
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501
- Gaffney EF, O'Neill AJ, Staunton MJ. In situ end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung carcinoma. *J Clin Pathol* 1995;48:1017-1021
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:88-91
- Wang J, Liu X, Jiang W, Liang L. Telomerase activity and expression of the telomerase catalytic subunit gene in non-small cell lung cancer: correlation with decreased apoptosis and clinical prognosis. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:985-990
- Adell GC, Zhang H, Evertsson S, Sun XF, Stal OH, Nordenskjöld BA. Apoptosis in rectal carcinoma: prognosis and recurrence after preoperative radiotherapy. *Cancer* 2001;91:1870-1875
- Pan W, Ishii H, Ebihara Y, Gobe G. Prognostic use of growth characteristics of early gastric cancer and expression patterns of apoptotic, cell proliferation, and cell adhesion proteins. *J Surg Oncol* 2003;82:104-110
- Jesioneck-Kupnicka D, Tenderenda M, Rutkowski P. Extent of spontaneous apoptosis in gastric cancer: relation to proliferative index, p53 expression, CD 34 expression and histopathological features. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:371-375
- Ikeguchi M, Cai J, Yamane N, Maeta M, Kaibara N. Clinical significance of spontaneous apoptosis in advanced gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1999;85:2329-2335

- 20 Aizawa K, Ueki K, Suzuki S, Yabusaki H, Kanda T, Nishimaki T, Suzuki T, Hatakeyama K. Apoptosis and Bcl-2 expression in gastric carcinomas: correlation with clinicopathological variables, p53 expression, cell proliferation and prognosis. *Int J Oncol* 1999;14:85-91
- 21 Osaki M, Kase S, Kodani I, Watanabe M, Adachi H, Ito H. Expression of Fas and Fas ligand in human gastric adenomas and intestinal-type carcinomas: correlation with proliferation and apoptosis. *Gastric Cancer* 2001;4:198-205
- 22 Koshida Y, Saegusa M, Okayasu I. Apoptosis, cell proliferation and expression of Bcl-2 and Bax in gastric carcinomas: immunohistochemical and clinicopathological study. *Br J Cancer* 1997;75:367-373
- 23 Shinohara T, Ohshima K, Murayama H, Kikuchi M, Yamashita Y, Shirakusa T. Apoptosis and proliferation in gastric carcinoma: the association with histological type. *Histopathology* 1996;29:123-129
- 24 Inada T, Kikuyama S, Ichikawa A, Igarashi S, Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:2003-2010
- 25 Gunzer M, Janich S, Varga G, Grabbe S. Dendritic cells and tumor immunity. *Semin Immunol* 2001;13:291-302
- 26 Shimamura H, Cumberland R, Hiroishi K, Watkins SC, Lotze MT, Baar J. Murine dendritic cell-induced tumor apoptosis is partially mediated by nitric oxide. *J Immunother* 2002;25:226-234
- 27 Chapoval AI, Tamada K, Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 2000;95:2346-2351
- 28 Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- 29 Zhang JK, Li J, Chen HB, Sun JL, Qu YJ, Lu JJ. Antitumor activities of human dendritic cells derived from peripheral and cord blood. *World J Gastroenterol* 2002;8:87-90
- 30 李明松, 袁爱力, 张万岱, 刘思德, 吕爱民, 周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. *世界华人消化杂志* 1999;7:161-163
- 31 Takahashi A, Kono K, Itakura J, Amemiya H, Feng Tang R, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y. Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology* 2002;62:121-127
- 32 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 张亚历, 周殿元. 大肠癌患者外周血树突状细胞免疫功能研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:429
- 33 Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Xiangming C, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Lett* 2000;159:103-108
- 34 Saito H, Tsujitani S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Combined analysis of tumour neoangiogenesis and local immune response in advanced gastric carcinoma. *Oncol Rep* 1999;6:459-463
- 35 Samson PS, Escovidal LA, Yrastorza SG, Veneracion RG, Nerves MY. Re-study of gastric cancer: analysis of outcome. *World J Surg* 2002;26:428-433
- 36 Green D, Ponce de Leon S, Leon-Rodriguez E, Sosa-Sanchez R. Adenocarcinoma of the stomach: univariate and multivariate analysis of factors associated with survival. *Am J Clin Oncol* 2002;25:84-89
- 37 Klein Kranenbarg E, Hermans J, van Krieken JH, van de Velde CJ. Evaluation of the 5th edition of the TNM classification for gastric cancer: improved prognostic value. *Br J Cancer* 2001;84:64-71

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica ,EM)》和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal)收录. 国内被以下检索系统收录, 分别为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊之一), 中国学术期刊文摘, 中国生物医学文献光盘数据库, 中文科技资料目录医药卫生, 解放军医学图书馆CMCC系统, 中国医学文摘外科学分册(英文版), 中国医学文摘内科学分册(英文版), 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. 世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995年度, 1998年度, 1999年度, 2000年度2001年度, 分别被评为山西省一级期刊. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001年度世界华人消化杂志®总被引频次6468, 影响因子3.733, 即年指标0.747, 他引总引比0.2, 海外作者论文比0.012, 地区分布数29, 基金和资助论文比例0.176, 指标综合加权评分76.96. 世界华人消化杂志®大16开, 200页, 月刊, 定价24.00元/期, 邮发代号82-262. E-mail: wcjd@wjgnet.com <http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

# 雌激素诱导基因PS2/TFF1在胃癌及癌前病变中的表达

李俊美, 罗和生, 姚宏昌

李俊美, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
姚宏昌, 天津市第一中心医院消化科 天津市 300192  
李俊美, 女, 1968-12-27 生, 山东莱州市人, 汉族. 1992 年山东医科大学本科毕业, 武汉大学在职硕士研究生. 研究方向为胃肠疾病防治.  
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科.  
lijunmei@sohu.com  
收稿日期: 2002-11-11 接受日期: 2002-12-07

## Expression of estrogen inducing gene PS2/TFF1 in gastric cancer and pre-cancerous lesions

Jun-Mei Li, He-Sheng Luo, Hong-Chang Yao

Jun-Mei Li, He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Hong-Chang Yao, Department of Gastroenterology, First Central Hospital of Tianjin City, Tianjin 300192, China  
Correspondence to: He-Sheng Luo, Department of Gastroenterology, First Central Hospital of Tianjin City, Tianjin 300192, China. lijunmei@sohu.com  
Received: 2002-11-11 Accepted: 2002-12-07

## Abstract

**AIM:** To determine the significance of PS2/TFF1 protein expression in chronic superficial gastritis (CSG), gastric ulcer (GU), gastric mucosal intestinal metaplasia (IM), gastric mucosal dysplasia and gastric cancer (GC).

**METHODS:** Pathologic specimens of 121 patients with gastric mucosal diseases and 20 healthy volunteers were immunostained for PS2/TFF1.

**RESULTS:** Positive PS2/TFF1 staining was seen throughout all epithelia with normal gastric mucosae, CSG, GU and in complete type of intestinal metaplasia (20/21). On the contrary, 11 of 20 incomplete type of intestinal metaplasia had positive staining ( $P < 0.01$ ). The expressions of PS2/TFF1 protein in CSG and GU were significantly higher than that in control group ( $P < 0.01$ ), while the expressions of PS2/TFF1 protein in IM, gastric mucosal dysplasia and GC were obviously lower than that in control group ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Our results indicate that PS2/TFF1 may play an important role in gastric mucosal protection, and loss of PS2/TFF1 expression may occur as an early event in the malignant transformation process of intestinal-type tumors.

Li JM, Luo HS, Yao HC. Expression of estrogen inducing gene PS2/TFF1 in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1302-1305

## 摘要

**目的:** 明确乳腺癌雌激素诱导基因PS2/TFF1在胃癌及癌前病变中的表达及其意义。

**方法:** 采用免疫组织化学方法测定121例患者(慢性浅表性胃炎20例、胃溃疡20例、不典型增生20例、不完全肠化生20例、完全肠化生21例及胃癌20例)及20名健康志愿者胃黏膜组织中PS2/TFF1蛋白的表达。

**结果:** PS2/TFF1在慢性浅表性胃炎、胃溃疡中表达与对照组比较明显增加(慢性胃炎组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 7.721$ ; 胃溃疡组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 5.256$ ), 在不典型增生、不完全肠化生及胃癌中表达比对照组明显减低(不典型增生组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 8.051$ ; 不完全肠化生组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 11.356$ ; 胃癌组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 8.238$ ), 在完全肠化生组 PS2/TFF1 表达无明显增高(20/21, 95.24%), 与不完全肠化生组表达(11/20, 55%)相比差异显著( $P < 0.01$   $\chi^2 = 8.994$ )。

**结论:** (1) PS2/TFF1蛋白在胃黏膜保护中可能起重要作用;(2) PS2/TFF1的表达缺失可能是胃肿瘤恶性转化过程中的早期事件。

李俊美, 罗和生, 姚宏昌. 雌激素诱导基因PS2/TFF1在胃癌及癌前病变中的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1302-1305  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1302.asp>

## 0 引言

PS2/TFF1 基因又称乳腺癌雌激素诱导基因, 于1982年首次从乳腺癌细胞系 MCF-7 中提取并测序鉴定. 其编码的 PS2/TFF1 蛋白和解痉多肽(TFF2)、肠三叶因子(TFF3)含有相同的三叶草结构域(TFF), 他们共同组成了三叶因子家族. 在人体, PS2/TFF1 仅在正常胃组织中表达. 在胃肠道炎症和许多癌组织中也有异常表达<sup>[1-4]</sup>. 但 PS2/TFF1 在胃肠道中的作用和意义仍不清楚. 本研究采用免疫组化方法, 旨在探讨 PS2/TFF1 在胃炎、胃溃疡、胃癌前病变和胃癌中的表达和意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集武汉大学人民医院病理科1998/2000年外科手术及内窥镜下活检组织的石蜡包埋标本141例, 其中正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、胃溃疡、胃黏膜不典型增生、胃黏膜不完全肠化生、胃癌各20例, 胃黏膜完全肠化生21例均经病理确诊. 男85例, 女56例, 平均年龄48岁(31-63岁)。

**1.2 方法** 所有标本均经100 mL/L 甲醛固定, 常规脱水, 透明, 浸蜡, 制成5  $\mu$ m 厚连续切片, 免疫组化 SP 法:



第一抗体为山羊抗人 PS2/TFF1 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), 脱蜡水化后, 置于柠檬酸缓冲液(pH 值 6.0)中煮沸 20 min, 再保温 10 min, 作抗原修复; 按试剂盒(福州迈新公司)说明操作. 阳性显示细胞质内均匀棕黄颗粒, 灶性及散在分布. 每张组织切片取 5 个高倍镜视野(400 倍), 每个视野计数 100 个细胞计算阳性细胞百分率, 取平均百分率为显色指数, 阳性细胞(10 % 为阴性), 10 % 为阳性. 对于阳性程度的判定如下: 10-20 % 为 +, 21-40 % 为 ++, 41-70 % 为 +++, 70 % 为 +++++. PBS 代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片作阳性对照.

统计学处理 采用  $\chi^2$  检验和秩和检验.

## 2 结果

2.1 PS2/TFF1 在正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、胃溃疡、胃黏膜肠化、不典型增生、胃癌中的表达 PS2/TFF1 在正常胃黏膜、慢性浅表性胃炎、胃溃疡、胃黏膜完全肠化生、胃黏膜不完全肠化生、胃黏膜不典型增生、胃癌中的表达阳性率分别为 100 %, 100 %, 100 %, 95.24 %, 55 %, 60 %, 20 % (表 1). PS2/TFF1 在正常胃黏膜的浅层上皮细胞中表达; 在慢性浅表性胃炎、消化性溃疡中不仅浅层上皮细胞中表达, 而且黏膜深部细胞也有细胞质染色(图 1), 二者与对照组比较差异显著(慢性胃炎组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 7.721$ ; 胃溃疡组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 5.256$ ) (表 2); 慢性浅表性胃炎组与胃溃疡组比较差异无显著性, ( $P > 0.05$   $q = 0.163$ ); PS2/TFF1 在不完全性肠化生、不典型增生、胃癌中部分胞质染色(图 2), 与正常对照组比较有极显著性差异(不典型增生组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 8.051$ ; 不完全肠化生组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 11.356$ ; 胃癌组 vs 正常对照组  $P < 0.01$   $q = 8.238$ ) (表 2), 不完全性肠化生组与胃癌组比较差异显著( $P < 0.05$   $q = 3.314$ ), 不典型增生组与胃癌组比较差异显著( $P < 0.01$   $q = 4.269$ ), 而不完全肠化生组与不典型增生组比较无显著性差异, ( $P > 0.05$   $q = 0.692$ ).

表 1 不同胃黏膜 PS2/TFF1 蛋白表达的情况

分组	<i>n</i>	阳性率 (%)
对照组	20	100 (20)
浅表胃炎组	20	100 (20)
胃溃疡组	20	100 (20)
不典型增生组	20	60 (12)
肠化生组		
完全肠化生	21	95.24(20)
不完全肠化生	20	55(11) <sup>a</sup>
胃癌组	20	20 (4)

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 完全肠化生组.

2.2 PS2/TFF1 表达与胃黏膜肠化生类型的关系 本实验观察到, PS2/TFF1 表达缺失主要发生在不完全性肠化生的胃黏膜中, 完全性肠化生的胃黏膜中几乎无 PS2/TFF1 的表达缺失, PS2/TFF1 在二者中的表达分别为 95.24 %, 55 %, 二者比较有差异( $P < 0.01$   $\chi^2 = 8.994$ ) (表 1).

表 2 不同胃黏膜 PS2/TFF1 蛋白表达的阳性情况

	正常胃黏膜	浅表性胃炎 <sup>a</sup>	胃溃疡 <sup>a</sup>	不典型增生 <sup>ac</sup>	不完全肠化生 <sup>ab</sup>	胃癌 <sup>a</sup>
-	0	0	0	8	9	16
+	2	0	0	8	3	3
++	4	1	0	3	7	1
+++	5	3	4	1	1	0
++++	9	16	16	0	0	0

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照组, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 胃癌组, <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs 胃癌组.

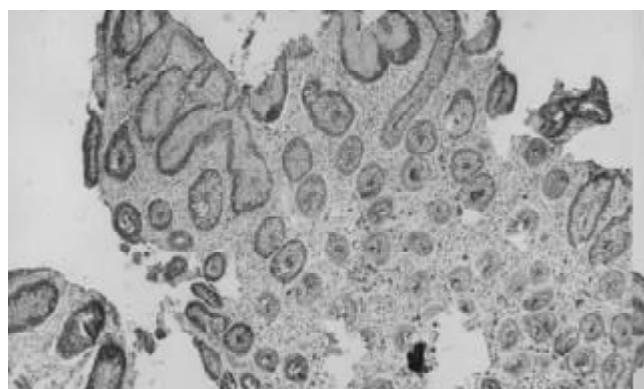


图 1 PS2/TFF1 蛋白在浅表性胃炎中的表达(SP 法  $\times 100$ ).

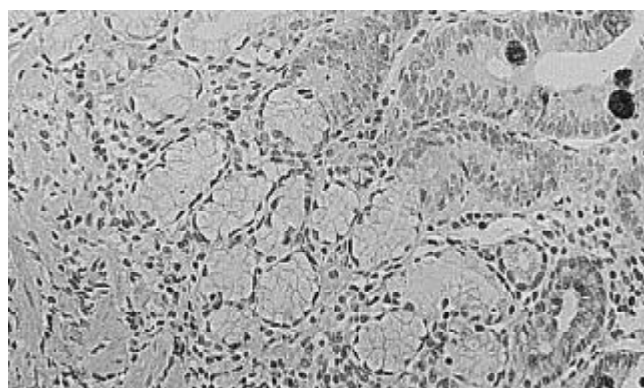


图 2 PS2/TFF1 蛋白在不完全肠化生中的表达(SP 法  $\times 200$ ).

## 3 讨论

PS2/TFF1 基因又称乳腺癌雌激素诱导基因, 于 1982 年首次从乳腺癌细胞系 MCF-7 中提取并测序鉴定. 其编码的 pS2 蛋白和猪解痉多肽(SP)、小肠三叶因子(ITF)含有相同的三叶草结构域(TFF), 他们共同组成了三叶因子家族. 正常情况下 PS2/TFF1 仅在成人胃组织中表达, 胃底、胃窦和幽门腺的黏膜内均表达 PS2/TFF1, 主要定位于胃小凹上层的表皮细胞内, 该处的细胞分化可以限制腺体的增生和形成具有分泌功能的黏膜. 在病理状

态下, 整个胃肠道均有 PS2/TFF1 的异位表达<sup>[2-6]</sup>, 特别是在溃疡的愈合期的再生组织中, PS2/TFF1 的表达明显增加<sup>[7]</sup>. 但是 PS2/TFF1 在胃肠疾病以及胃肠肿瘤形成过程中的作用机制和意义目前仍未研究清楚.

本研究发现慢性浅表性胃炎、消化性溃疡组, 胃黏膜 PS2/TFF1 不仅在浅层上皮细胞中表达, 而且在黏膜深部细胞也有明显表达, 较正常胃黏膜表达明显增高,  $P < 0.01$ . 说明 PS2/TFF1 在维持胃肠道黏膜的完整及修复损伤中可能起重要作用. Ulaganathan et al<sup>[8]</sup>在动物试验中发现 PS2/TFF1 及其 mRNA 在溃疡后 4-28 d 可明显被诱导产生, 并且不仅在表层上皮细胞中表达, 而且也在修复黏膜深部的酸性产粘蛋白细胞中表达, 提示 PS2/TFF1 是黏膜修复过程后期的递质. 有资料表明<sup>[9]</sup>, PS2/TFF1 可以使伤口周围的上皮细胞向损伤部位迁移. 因此, PS2/TFF1 可能通过引发细胞运动来重建上皮的完整; 另外, PS2/TFF1 与黏液素密切相关<sup>[10-12]</sup>, PS2/TFF1 结构域有与糖蛋白侧链直接作用的位点, 而黏液素是一种糖蛋白, 在正常和病理情况下, 表达黏液素的细胞优先表达 PS2/TFF1; PS2/TFF1 基因敲除小鼠胃内缺乏 PS2/TFF1, 黏液缺失<sup>[13]</sup>. 而在胃溃疡的状态下, 溃疡相关细胞系附近的杯状细胞将 PS2/TFF1 与黏液素共同包被, 可能会被释放到胃腔内, 因此, PS2/TFF1 不仅是胃黏膜分泌的胃液成分, 而且, 可能参与黏液的聚合反应和分泌活动, PS2/TFF1 在胃内主要以 PS2/TFF1 复合物的形式存在, 和黏蛋白紧密结合在一起, 形成高黏度的黏液凝胶, 增加黏液的稳定性, 减少  $H^+$  渗透及有害刺激物对黏膜的损害, 从而增强了胃肠黏膜防御能力.

胃癌是消化道常见肿瘤之一, 至今其发病机制尚未阐明, 多数学者认为与饮食、遗传、幽门螺旋杆菌、癌前情况等有关<sup>[14-30]</sup>. 上皮细胞的生长发育受癌基因和抑癌基因间的平衡调节, 若平衡失调, 则可能出现癌变. 本研究发现, PS2/TFF1 在胃癌前病变及胃癌组织中的表达比正常胃黏膜低, 在正常胃黏膜 PS2/TFF1 表达阳性率为 100%, 在不完全性肠化生、不典型增生分别为 55% 和 60%, 这与国外学者所做的体外实验及动物实验结果基本一致<sup>[31]</sup>. 现有的研究发现 PS2/TFF1 在体外可抑制胃腺癌细胞系 AGS 的生长, PS2/TFF1 基因敲除大鼠的胃表层上皮细胞严重增生, 在胃窦部可形成腺瘤, 甚至形成侵袭性的肿瘤, 故推测 PS2/TFF1 可能为胃特异性肿瘤抑制基因<sup>[32-36]</sup>. 胃癌组织中 PS2/TFF1 表达降低可能与 PS2/TFF1 基因启动子区域的甲基化有关, 且认为启动子区域的甲基化可能是高分化胃癌形成的早期事件<sup>[37]</sup>.

#### 4 参考文献

- Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 2001;16:319-334
- Balcer-Kubiczek EK, Harrison GH, Xu JF, Gutierrez PL. Coordinate late expression of trefoil peptide genes (pS2/TFF1 and ITF/TFF3) in human breast, colon, and gastric tumor cells

- exposed to X-rays. *Mol Cancer Ther* 2002;1:405-415
- Dossinger V, Kayademir T, Blin N, Gott P. Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:197-206
- Leung WK, Yu J, Chan FK, To KF, Chan MW, Ebert MP, Ng EK, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Expression of trefoil peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissues. *J Pathol* 2002;197:582-588
- Kirikoshi H, Katoh M. Expression of TFF1, TFF2 and TFF3 in gastric cancer. *Int J Oncol* 2002;21:655-659
- Nogueira AM, Machado JC, Carneiro F, Reis CA, Gott P, Sobrinho-Simoes M. Patterns of expression of trefoil peptides and mucins in gastric polyps with and without malignant transformation. *J Pathol* 1999;187:541-548
- Saitoh T, Mochizuki T, Suda T, Aoyagi Y, Tsukada Y, Narisawa R, Asakura H. Elevation of TFF1 gene expression during healing of gastric ulcer at non-ulcerated sites in the stomach: semiquantification using the single tube method of polymerase chain reaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:604-609
- Ulaganathan M, Familiari M, Yeomans ND, Giraud AS, Cook GA. Spatio-temporal expression of trefoil peptide following severe gastric ulceration in the rat implicates it in late-stage repair processes. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:506-512
- Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378:F61-77
- Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Thomas MG. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000;47:792-800
- Newton JL, Allen A, Westley BR, May FE. The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 2000;46:312-320
- Tomasetto C, Masson R, Linares JL, Wendling C, Lefebvre O, Chenard MP, Rio MC. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology* 2000;118:70-80
- Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, Linares J, Dierich A, LeMeur M, Wendling C, Tomasetto C, Chambon P, Rio MC. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 1996;274:204
- Xue YW, Zhang QF, Zhu ZB, Wang Q, Fu SB. Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:250-253
- Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with Hp-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- Wu J, Shi YQ, Wu KC, Zhang DX, Yang JH, Fan DM. Angiostatin up-regulation in gastric cancer cell SGC7901 inhibits tumorigenesis in nude mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:59-64
- Liu HJ, Guo XL, Dong M, Wang L, Yuan Y. Association between pepsinogen C gene polymorphism and genetic predisposition to gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:50-53
- Chen Y, Wu Q, Song SY, Su WJ. Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1014-1018
- Guo DL, Dong M, Wang L, Sun LP, Yuan Y. Expression of gastric cancer-associated MG7 antigen in gastric cancer, pre-cancerous lesions and *H pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:1009-1013
- Liu JR, Chen BQ, Yang YM, Wang XL, Xue YB, Zheng YM, Liu RH. Effect of apoptosis on gastric adenocarcinoma cell line SGC-7901 induced by cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid. *World J Gastroenterol* 2002;8:999-1004

- 22 Wu K, Li Y, Zhao Y, Shan YJ, Xia W, Yu WP, Zhao L. Roles of Fas signaling pathway in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:982-986
- 23 Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- 24 Zhao Y, Wu K, Xia W, Shan YJ, Wu LJ, Yu WP. The effects of vitamin E succinate on the expression of c-jun gene and protein in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:782-786
- 25 Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:586-590
- 26 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. The role of KDR in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:596-601
- 27 Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1103-1107
- 28 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Wang GA, Teng XC. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and gastric precancerous lesions: a follow-up study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:912-915
- 29 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 30 Hao DM, Sun XJ, Zheng ZH, He G, Ma MC, Xu HM, Wang MX, Sun KL. Screening and expression of associated genes in gastric dysplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:6-9
- 31 Taupin D, Pedersen J, Familiar M, Cook G, Yeomans N, Giraud AS. Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab Invest* 2001;81:397-408
- 32 Bossenmeyer-Pourie C, Kannan R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, Tomasetto C, Rio MC. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis. *J Cell Biol* 2002;157:761-770
- 33 Park WS, Oh RR, Park JY, Lee JH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Kim YS, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY. Somatic mutations of the trefoil factor family 1 gene in gastric cancer. *Gastroenterology* 2000;119:691-698
- 34 Park WS, Oh RR, Park JY, Yoo NJ, Lee SH, Shin MS, Kim SY, Kim YS, Lee JH, Kim HS, An WG, Lee JY. Mapping of a new target region of allelic loss at 21q22 in primary gastric cancers. *Cancer Lett* 2000;159:15-21
- 35 Calnan DP, Westley BR, May FE, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ. The trefoil peptide TFF1 inhibits the growth of the human gastric adenocarcinoma cell line AGS. *J Pathol* 1999;188:312-317
- 36 Carvalho R, Kayademir T, Soares P, Canedo P, Sousa S, Oliveira C, Leistenschneider P, Seruca R, Gott P, Blin N, Carneiro F, Machado JC. Loss of heterozygosity and promoter methylation, but not mutation, may underlie loss of TFF1 in gastric carcinoma. *Lab Invest* 2002;82:1319-1326
- 37 Fujimoto J, Yasui W, Tahara H, Tahara E, Kudo Y, Yokozaki H, Tahara E. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett* 2000;149:125-134



# GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联

张友才, 邓长生, 周 燕, 朱尤庆

张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

张友才, 男, 1968-07-01 生, 湖北省大悟县人, 汉族. 1991 年湖北医学院咸宁分院本科毕业, 2001 年武汉大学医学院硕士研究生毕业, 现为武汉大学医学院博士生, 主治医师. 主要从事消化道肿瘤分子遗传学研究, 发表论文 20 篇. 项目负责人: 张友才, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路 169 号, 武汉大学中南医院消化内科. zhayc0701@163.com  
电话: 027-87335764

收稿日期: 2002-11-12 接受日期: 2002-12-03

## Association of glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms with *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma

You-Cai Zhang, Chang-Sheng Deng, Yan Zhou, You-Qing Zhu

You-Cai Zhang, Chang-Sheng Deng, Yan Zhou, You-Qing Zhu, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: You-Cai Zhang, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China. zhayc0701@163.com

Received: 2002-11-12 Accepted: 2002-12-03

## Abstract

**AIM:** To study the association of genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and T1 (GSTM1, GSTT1) with clinicopathological features of gastric adenocarcinoma (GAC) and *Helicobacter pylori* (Hp) infection.

**METHODS:** All subjects were unrelated Han people in Hubei Province of China. Using multiplex PCR, we studied the genetic polymorphisms of the GSTM1, GSTT1 genes. Hp infection was determined by IgG antibodies to Hp in stPed serum samples using enzyme-linked immunosorbent assay and <sup>14</sup>C urea breath test.

**RESULTS:** The null genotype fP GSTM1 was mPe significantly common in GACs when compared with controls ( $\chi^2=5.40$ ,  $P<0.05$ ), and mPe common in early stage of GACs when compared with controls too ( $\chi^2=4.74$ ,  $P<0.05$ ). All the differences of the frequency of GSTM1 null genotype between advanced stage GACs P intestinal type carcinomas P diffuse type carcinomas and controls did not reach statistical significance. The null genotype fP GSTT1 was significantly mPe common among intestinal type GACs when compared with controls ( $\chi^2=4.09$ ,  $P<0.05$ ), but all the differences of the frequency of GSTT1 null genotype between early stage GACs P advanced stage GACs P diffuse type carcinomas and controls did not reach statistical significance. The subjects carrying both of the null genotypes fP GSTM1 and GSTT1 had mPe than 3.38-fold risk fP developing GAC compared with the subjects carrying both of the nonnull genotypes fP

GSTM1 and GSTT1 (adjusted odds ratio,  $P=3.38$ , 95 % confidence interval, CI=1.58-7.51). The null genotype fP GSTM1 was mPe significantly common among those patients with Hp positive GAC compared with Hp positive controls ( $\chi^2=6.68$ ,  $P<0.01$ ).

**CONCLUSION:** The null genotype fP GSTM1 has an increased risk of GAC, and most tumors are in early stage GACs. The null genotype fP GSTT1 is significantly related to the intestinal type GAC, but not significantly related to the tumor stage. Subjects carrying both of the null genotypes fP GSTM1 and GSTT1 have increased risks fP GAC, GSTM1 gene polymorphisms and Hp infection may interact with each other in the initialization of GAC.

Zhang YC, Deng CS, Zhou Y, Zhu YQ. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms with *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1306-1309

## 摘要

**目的:** 探讨 GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌(GAC)临床特征及其与幽门螺杆菌(Hp)感染的相关性.

**方法:** 应用多重聚合酶链反应(PCR)技术, 检测 GSTM1, GSTT1 基因多态性; <sup>14</sup>C 尿素呼气试验和外周血 ELISA 法检测 Hp 感染情况.

**结果:** GAC 患者 GSTM1 空白基因型频率明显高于健康人, 其差异有统计学意义( $\chi^2=5.40$ ,  $P<0.05$ ), GSTT1 空白基因型频率在 GAC 患者与对照组间的差异无统计学意义; GSTM1 空白基因型频率在早期 GAC 患者与对照组间的差异有统计学意义( $\chi^2=4.74$ ,  $P<0.05$ ), 在进展期、肠型及弥漫型 GAC 与对照组间的差异均无统计学意义; GSTT1 空白基因型频率在肠型 GAC 患者与对照组间的差异有统计学意义( $\chi^2=4.09$ ,  $P<0.05$ ), 在早期、进展期及弥漫型 GAC 与对照组间的差异均无统计学意义. GSTM1, GSTT1 均为空白基因型的个体患 GAC 的危险性是 GSTM1, GSTT1 均为非空白基因型个体的 3.38 倍(校正  $P=3.38$ , 95 % CI=1.58-7.51). GSTM1 空白基因型频率, 在 Hp 感染的 GAC 患者与 Hp 感染的对照组间的差异有统计学意义( $\chi^2=6.68$ ,  $P<0.01$ ).

**结论:** GSTM1 空白基因型与 GAC 易感性有关, 肿瘤多处于早期, GSTT1 空白基因型与肠型 GAC 易感性有关, 与肿瘤的临床分期无关; GSTM1, GSTT1 均为空白基因型的个体患 GAC 的危险性增加; GSTM1 基因多态和 Hp 感染有

## 协同促GAC发生的作用.

张友才, 邓长生, 周燕, 朱尤庆. GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌及幽门螺杆菌感染的关联. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1306-1309

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1306.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是胃癌发生的高危因素<sup>[1-12]</sup>, 然其确切的致癌机制并未明了. 谷胱甘肽 S- 转移酶(glutathione S-transferase, GST) M1, T1 是Ⅱ相毒物代谢酶的重要成员, 广泛存在多态性, 具 GSTM1, GSTT1 基因多态的个体, 其酶活性下降, 对进入体内的前致癌物降解能力下降, 机体患肿瘤的危险性增加<sup>[13-21]</sup>. 我们探讨 GSTM1, GSTT1 基因多态与胃腺癌(gastric adenocarcinoma, GAC)及其与 Hp 感染的相关性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 武汉大学中南医院肿瘤科经病理组织学确诊的 GAC 患者 127 例, 其中早期 GAC 39 例, 进展期 88 例; 肠型 GAC 76 例, 弥漫型 51 例. 排除近期有抗生素及非甾体抗炎药服用史者; 合并有食管或肠道恶性病变者; 有胃手术史及胃癌家族史者. 对照组 114 例, 为同期在本院体检的无血缘关系的健康人. 研究对象均为湖北地区汉族人, 所有研究对象均行<sup>14</sup>C 尿素呼气试验和血清抗 Hp-IgG 抗体检测, 二者均为阳性者, 确定为 Hp 感染阳性.

**1.2 方法** GSTM1, GSTT1 基因型检测(多重 PCR 法)以研究对象外周血提取的基因组 DNA 为模板, 行多重 PCR 检测. 扩增 GSTM1 的引物序列为 5'-GAAGTCCC TGAAAAGCTAAAGC-3' 和 5'-GTTGGGCTCAAATA TACGGTGG-3', 扩增 GSTT1 的引物序列为 5'-TTC CTTACTGGTCTCCTCACATCTC-3' 和 5'-TCACCGGA TCATGGCCAGCA-3', 同时扩增  $\beta$ -globulin 为内参照, 所用引物为 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' 和 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'. 反应条件为: 97℃ 预变性 5 min, 进入热循环后, 95℃ 变性 45 s, 57℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 60 s, 循环 35 次后, 72℃ 再延

伸 5 min. 反应终止后经 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)(扩增 GSTT1 时退火温度为 55℃, 用 50 g/L PAGE), 1.8 g/L 硝酸银染色分析电泳结果(图 1, 2: GSTM1 非空白基因型的 PCR 产物长 230 bp, GSTT1 非空白基因型的 PCR 产物长 480 bp,  $\beta$ -globulin 的 PCR 产物长 268 bp).

统计学处理 以  $\chi^2$  检验分析 GSTM1, GSTT1 空白基因型频率差异, 以非条件 Logistic 回归法计算表示相对危险度的比值比(odds ratio, P)及 95% 可信区间(confidence interval, CI). P 值均以潜在的混淆因素如年龄、性别等校正.

## 2 结果

GSTM1 空白基因型在 GAC 和对照组中的频率分别为 61.4% 和 46.5%, 其差异有统计学意义(校正  $P=1.80$ , 95% CI=1.08-3.10,  $\chi^2=5.40$ ,  $P<0.05$ , 表 1), GSTT1 空白基因型在二者间的频率差异无统计学意义; GSTM1 空白基因型在早期、进展期、肠型及弥漫型 GAC 患者中的频率分别为 66.7%, 59.1%, 60.5% 和 62.7%, GSTT1 的频率分别为 61.5%, 59.1%, 63.2% 和 54.9%, 与对照组比较, 早期 GAC 患者 GSTM1 频率的差异有统计学意义(校正  $P=2.26$ , 95% CI=1.05-4.90,  $\chi^2=4.74$ ,  $P<0.05$ ), 肠型 GAC 患者 GSTT1 空白基因型的频率差异也有统计学意义(校正  $P=1.80$ , 95% CI=1.78-3.38,  $\chi^2=4.09$ ,  $P<0.05$ ). 提示, GSTM1 空白基因型与 GAC 易感性有关, 肿瘤多处于早期, GSTT1 空白基因型与肠型 GAC 易感性有关, 与肿瘤有临床分期无关.

在 GAC 组, a 联合型(GSTM1/GSTT1 非空白基因型)频率为 15.7%, b 联合型(GSTM1 非空白基因型/GSTT1 空白基因型)频率为 18.9%, c 联合型(GSTM1 空白基因型/GSTT1 非空白基因型)频率为 27.6%, d 联合型(GSTM1, T1 均为空白基因型)频率为 37.8%; 对照组分别为 28.9%, 27.2%, 23.7% 和 20.2% (表 2). 将 a 联合型视为暴露因素, 则 b, c, d 联合型的个体患 GAC 的危险性分别上升 1.24 倍(校正  $P=1.24$ , 95% CI=0.55-2.84), 2.10 倍(校正  $P=2.10$ , 95% CI=1.00-4.80)和 3.38 倍(校正  $P=3.38$ , 95% CI=1.58-7.51). 可认为: GSTM1, GSTT1 均为空白基因型的个体患 GAC 的危险

表 1 GSTM1, GSTT1 空白基因型与 GAC 及其临床病理特征关联

分组	n	M/F	年龄( $\bar{x} \pm s$ )	GSTM1 空白基因型 n(%)	校正 P (95% CI)	GSTT1 空白基因型 n (%)	校正 P (95% CI)
对照组	114	78/36	54 $\pm$ 10	53 (46.5%)		55 (48.2%)	
GAC	127	89/38	55 $\pm$ 9	78 (61.4%) <sup>a</sup>	1.80 (1.08-3.10)	76 (59.8%)	1.58 (0.92-2.86)
早期	39	32/7	54 $\pm$ 11	26 (66.7%) <sup>b</sup>	2.26 (1.05-4.90)	24 (61.5%)	1.70 (0.80-3.62)
进展期	88	57/31	57 $\pm$ 9	52 (59.1%)	1.62 (0.90-2.91)	52 (59.1%)	1.52 (0.82-2.75)
弥漫型	51	38/13	56 $\pm$ 12	32 (62.7%)	1.92 (0.93-3.84)	28 (54.9%)	1.27 (0.65-2.56)
肠型	76	51/25	54 $\pm$ 9	46 (60.5%)	1.75 (0.95-3.20)	48 (63.2%) <sup>c</sup>	1.80 (1.78-3.38)

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 对照组

性显著增加, 该联合基因型为 GAC 的易感基因型。

GAC 患者 Hp 检出率为 70.1 % (89), 对照组为 61.4 % (70), 其检出率差异无统计学意义; GSTM1 空白基因型的频率在 Hp 阳性 GAC 患者、Hp 阳性对照组间的差异有统计学意义(66.3 % vs 45.7 %, 校正  $P=2.30$ , 95 % CI=1.20-4.78,  $\chi^2=6.68$ ,  $P<0.01$ ), GSTT1 空白基因型的频率在二者间的差异无统计学意义(68.5 % vs 52.9 %, 校正  $P=1.70$ , 95 % CI=0.85-3.52,  $\chi^2=2.76$ ,  $P>0.05$ ), 具 GSTM1 空白基因型的个体感染 Hp 后, 患 GAC 的危险性上升了 2.3 倍。提示, GSTM1 基因多态、Hp 感染间有协同促进 GAC 发生的作用。

表 2 胃腺癌 GSTM1, GSTT1 基因联合多态分析  $n$  (%)

分型	对照组 (114)	GAC(127)	校正 $P$ (95 % CI)
a 型: GSTM1, GSTT1 均			
为非空白基因型	33 (28.9 %)	20 (15.7 %)	
b 型: GSTM1 非空白基因型			
/GSTT1 空白基因型	31 (27.2 %)	24 (18.9 %)	1.24 (0.55-2.84)
c 型: GSTM1 空白基因型			
/GST T1 非空白基因型	27(23.7 %)	35 (27.6 %) <sup>e</sup>	2.10 (1.00-4.80)
d 型: GSTM1, GSTT1 均			
为空白基因型	23 (20.2 %)	48 (37.8 %) <sup>f</sup>	3.38 (1.58-7.51)

<sup>e</sup> $P<0.05$ ,  $\chi^2=4.01$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ ,  $\chi^2=10.05$  vs a 组。

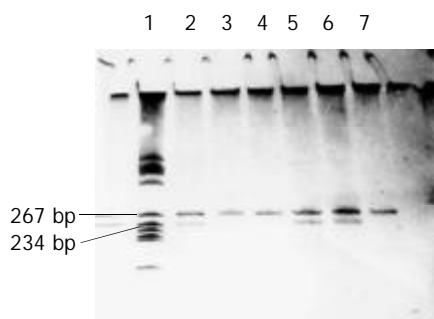


图1 1: pBR322/Hae III markers DNA 分子质量标志物; 3, 4, 7: GSTM1 空白基因型 GSTM1 基因和  $\beta$ -globulin 基因 PCR 扩增产物 PAGE 图。

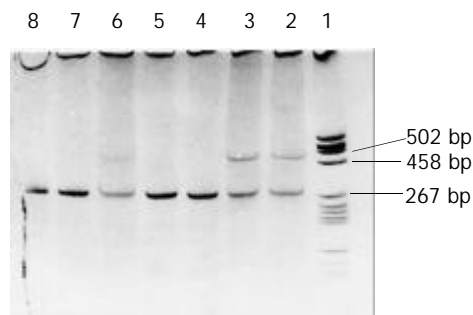


图2 1: pBR322/Hae III markers DNA 分子质量标志物; 2, 3: GSTT1 非空白基因型。GSTT1 基因和  $\beta$ -globulin 基因 PCR 扩增产物 PAGE 图。

### 3 讨论

GST 和谷胱甘肽(GSH)在人消化道上皮细胞中广泛存在, 是多种潜在致癌物如亚硝胺类混合物、苯并芘等

的重要解毒系统<sup>[22]</sup>。GSTM1, GSTT1 互为同功酶, 均存在空白基因型, 其空白基因型的个体在体内不能表达 GSTM1, GSTT1 蛋白, 对上述致癌物的降解能力下降, 肿瘤易感性增加。近年, GSTM1, GSTT1 基因多态与 GAC 易感性关联的结论尚有分歧<sup>[13, 19, 23]</sup>。Saadat et al<sup>[13]</sup>报道, GSTM1 空白基因型的个体 GAC 的危险性增加( $P=2.3$ , 95 % CI =1.2-5.0), GSTT1 空白基因型与 GAC 的易感性无关, 具 GSTM1, GSTT1 均为空白基因型的个体患 GAC 的危险性上升 1.3 倍。本实验结果显示, GSTM1 空白基因型与 GAC 易感性有关, 肿瘤多处于早期, 而 GSTM1, GSTT1 均为空白基因型的个体患 GAC 的危险性是 GSTM1, GSTT1 均为非空白基因型个体的 3.38 倍, GSTT1 空白基因型与肠型 GAC 易感性有关, 与肿瘤的临床分期无关。此与 Saadat et al<sup>[13]</sup>的结论相似。

大量的临床、病理学和血清学的调查结果在一定程度上肯定了 Hp 与胃癌发生的相关性。然胃癌的发生是多因素的结果, Hp 感染本身可能以一种促癌剂的形式存在<sup>[24, 25]</sup>。Hp 阳性患者胃黏膜 GSTs 活性及 GSH 含量均低于 Hp 阴性的患者( $P<0.001$ ), 认为慢性 Hp 感染减少胃黏膜 GSH 的含量, 降低 GST 活性, GST 解毒能力下降, 导致胃癌的危险性增加<sup>[26]</sup>。Hp 阳性 GAC 患者 GSTM1 空白基因型频率显著高于 Hp 阳性的对照组( $P=0.031$ ), 认为 Hp 感染可增加 GSTM1 空白基因型个体患 GAC 的危险性<sup>[27]</sup>。本结果也证实 GSTM1 基因多态、Hp 感染有协同促 GAC 发生的作用。而 Hp 感染率在 GAC 及对照组之间的差异无显著性, 可能与样本量较小, 或有低毒力菌株混杂有关。

Hp 所含的空泡毒素、尿素酶、磷脂酶等物质, 损伤胃黏膜上皮细胞, 破坏胃黏膜屏障, 进入胃黏膜上皮内的致癌物含量增加<sup>[6, 28, 29]</sup>; Hp 感染后, 黏膜内炎性细胞浸润并释放炎性递质、氧自由基等, 引起细胞炎症反应、增生加快, 易受到基因毒致癌物的损伤; 而 GST 空白基因型的个体, 对致癌物降解能力下降, 致癌物与细胞内生物大分子形成加合物, 导致肿瘤相关基因活化或失活, 终致肿瘤形成<sup>[3, 9, 30, 31]</sup>。这可能是 GSTM1 空白基因型的个体, Hp 感染后胃腺癌危险性增加的原因。

### 4 参考文献

- Xue FB, Xu YY, Wan Y, oran BR, Ren J, Fan DM. Association of *H. pylori* infection with gastric carcinoma: a meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- Lorente S, Doiz O, Trinidad-Serrano M, Castillo J, Lanás A. *Helicobacter pylori* stimulates pepsinogen secretion from isolated human peptic cells. *Gut* 2002;50:13-18
- Zhang Z, Yuan Y, Gao H, Dong M, Wang L, Gong YH. Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of *H. pylori* associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* 2001; 7:779-782
- Helicobacter and cancer collaborative group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001;49:347-353
- Miwa H, Go MF, Sato N. *Helicobacter pylori* and gastric cancer:



- the Asian enigma. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:1106-1112
- 6 Brenner H, Arndt V, Bode G, Stegmaier C, Ziegler H, Stumer T. Risk of gastric cancer among smokers infected with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer* 2002;98:446-449
  - 7 Blankfield Ror. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *New Engl J Med* 2002;246:65-67
  - 8 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
  - 9 Louw JA, Kidd MS, Kummer AF, Taylor K, Kotze U, Hanslo D. The relationship between *Helicobacter pylori* infection, the virulence genotypes of the infecting strain and gastric cancer in the African setting. *Helicobacter* 2001;6:268-273
  - 10 Chang WK, Kim HY, Kim DJ, Lee J, Orark CK, Yoo JY, Kim HJ, Kim MK, Choi BY, Choi HS, Orark KN. Association between *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric cancer in the Korean population, prospective case-controlled study. *J Gastroenterol* 2001;36:816-822
  - 11 Gurbuz AK, Ozel AM, Yazgan Y, Gunay A, Ozdemir S, Demirturk L, Emekdas G. Seropositivity against *Helicobacter pylori* Cag A in Turkish gastric cancer patients. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:389-392
  - 12 Miehlik S, Kirsch C, Dragosics B, Gschwandler M, Oberhuber G, Antos D, Dite P, Lauter J, Labenz J, Leodolter A, Malfertheiner P, Neubauer A, Ehninger G, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: current status of the Austrian-Czech-German gastric cancer prevention trial (PRISMA-study). *World J Gastroenterol* 2001;7:243-247
  - 13 Saadat I, Saadat M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancer. *Cancer Lett* 2001;169:21-26
  - 14 Welfare M, Monesola Adeokun A, Bassendine MF, Daly AK. orolymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and susceptibility to colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 1999;8:289-292
  - 15 Takezaki T, Gao CM, Wu JZ, Ding JH, Liu YT, Zhang Y, Li SP, Su P, Liu TK, Tajima K. Dietary protective and risk factors for esophageal and stomach cancers in a low-epidemic area for stomach cancer in Jiangsu orrovince, China: comparison with those in a high-epidemic area. *Jap J Cancer Res* 2001;92: 1157-1165
  - 16 Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, Brockmoller J, Clapper ML, Daly A, Dolzan V, Ford J, Gaspari L, Haugen A, Hirvonen A, Husgafvel-orursiainen K, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kihara M, Kremers P, Le Marchand L, London SJ, Nazar-Stewart V, Onon-Kihara M, Rannug A, Romkes M, Ryberg D, Seidegard J, Shields P, Strange RC, Stucker I, To-Figueras J, Brennan P, Taioli E. Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:1343-1350
  - 17 Engel LS, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus PM, Lan Q, Boffetta P, Vineis P, Autrup H, Bell DA, Branch RA, Brockmoller J, Daly AK, Heckbert SR, Kalina I, Kang D, Katoh T, Lafuente A, Lin HJ, Romkes M, TayIP JA, Rothman N. orooled analysis and meta-analysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2002;156:95-109
  - 18 Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, Lenz HJ. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 94:936-942
  - 19 Lan Q, Chow WH, Lissowska J, Hein DW, Buetow K, Engel LS, Ji B, Zatonski W, Rothman N. Glutathione S-transferase genotypes and stomach cancer in a population-based case-control study in Warsaw, Poland. *Pharmacogene* 2001;11: 655-661
  - 20 Sekine I, Saijo N. Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. *Ann Oncol* 2001;12:1515-1525
  - 21 van Delft JH, Steenwinkel MS, van Asten JG, de Vogel N, Bruijntjes-Rozier TC, Schouten T, Cramers P, Maas L, van Herwijnen MH, van Schooten F, Hopmans PM. Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Ann Occup Hygiene* 2001; 45:395-408
  - 22 de Kok TM, van Maanen JM. Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutat Res* 2000; 463:53-101
  - 23 Setiawan VW, Zhang ZF, Yu GP, Li YL, Lu ML, Tsai CJ, Cordova D, Wang MR, Guo CH, Yu SZ, Kurtz RC. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:73-80
  - 24 Oijen AH, Verhulst ML, Roelofs HM, Peters WH, de Boer WA, Jansen JB. Eradication of *Helicobacter pylori* restores glutathione S-transferase activity and glutathione levels in antral mucosa. *Jap J Cancer Res* 2001;92:1329-1334
  - 25 Verhulst ML, Hopman WP, Oreters WH, Jansen JB. Effects of *Helicobacter pylori* infection on endocrine and exocrine mucosal functions in the upper gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* 2000;232(Suppl):21-31
  - 26 Verhulst ML, van Oijen AH, Roelofs HM, Peters WH, Jansen JB. Antral glutathione concentration and glutathione S-transferase activity in patients with and without *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 2000;45:629-632
  - 27 Ng EK, Sung JJ, Ling TK, Ip SM, Lau JY, Chan AC, Liew CT, Chung SC. *Helicobacter pylori* and the null genotype of glutathione-S-transferase-muin patients with gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1998; 82:268-273
  - 28 Bagchi D, McGinn TR, Ye X, Bagchi M, Krohn RL, Chatterjee A, Stohs SJ. *Helicobacter pylori*-induced oxidative stress and DNA damage in a primary culture of human gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2002;47:1405-1412
  - 29 Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002;50:771-778
  - 30 Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterol* 2002;123:542-553
  - 31 Shibata A, orarsonnet J, Longacre TA, Garcia MI, Puligandla B, Davis RE, Vogelmann JH, Pentreich N, Habel LA. CagA status of *Helicobacter pylori* infection and p53 gene mutations in gastric adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2002;23:419-424

# 基质金属蛋白酶-7表达与胃癌临床病理生物学行为的关系

孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌

孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室 辽宁省沈阳市 110001

孙晋民, 女, 1954年生, 辽宁省开原市人, 汉族, 1979年毕业于辽宁大学化学系, 1992年中国医科大学生物化学硕士毕业, 现于中国医科大学附属第一医院攻读肿瘤学博士研究生, 教授。

项目负责人: 孙晋民, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室 sun\_jinmin@hotmail.com

电话: 086-24-23256666-6351 传真: 086-24-23253443

收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-11-28

## Relationship between expression of matrix metalloproteinase-7 and clinicopathobiological behaviors of gastric cancer

Ji-Min Sun, Hua-Chuan Zheng, Xue-Fei Yang, Yan Xin, Yin-Chang Zhang

Ji-Min Sun, Hua-Chuan Zheng, Xue-fei Yang, Yan Xin, Yin-Chang Zhang, Cancer Institute, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street 155, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Ji-Min Sun, Cancer Institute, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Nanjing North Street 155, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. sun-jinmin@hotmail.com  
Received: 2002-11-19 Accepted: 2002-11-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression in carcinogenesis and progression of gastric cancer.

**METHODS:** We studied MMP-7 expression and microvessel density (MVD) in primary foci of 113 cases of gastric cancer by streptavidin-biotin-immunoperoxidase method with anti-MMP-7 and anti-CD34 antibodies. MMP-7 expression and mean MVD in primary foci were compared with clinicopathological features of tumors, and the relationship between MMP-7 expression and mean microvessel densities (MVD) in gastric cancer was concerned as well.

**RESULTS:** MMP-7 showed positive expression in 29.2 % (33/113) of adjacent mucosa of gastric cancer was less than that in its primary foci (69.0 %, 78/113) of gastric cancer. MMP-7 expression in primary foci was closely correlated with tumor size, invasive depth, metastasis and TNM staging of gastric cancer ( $P < 0.05$ ) despite no significant relationship between its expression and differentiation or growth pattern ( $P > 0.05$ ). Positive correlation of mean MVD with tumor size, depth of invasion, metastasis and TNM staging was found ( $P < 0.05$ ), but no relationship was found between mean MVD or differentiation of gastric cancer ( $P > 0.05$ ). Especially, mean MVD was dependent on MMP-7 expression in gastric cancer ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** MMP-7 is an effective marker to reveal the biological behaviors of gastric cancer and plays an important

role in carcinogenesis and progression of gastric cancer by participating in growth, invasion, metastasis and angiogenesis.

Sun JM, Zheng HC, Yang XF, Xin Y, Zhang YC. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-7 and clinicopathobiological behaviors of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9): 1310-1313

## 摘要

**目的:** 研究基质金属蛋白酶-7(MMP-7)表达在胃癌发生和演进中的作用。

**方法:** 采用S-P免疫组化方法利用抗MMP-7、抗CD34抗体研究113例胃癌原发灶中MMP-7表达和微血管密度(MVD), 比较MMP-7表达和MVD与胃癌临床病理特征的关系, 分析胃癌组织中MMP-7表达与MVD的关系。

**结果:** MMP-7在胃癌旁黏膜中阳性表达率为29.2 % (33/113), 低于胃癌组织的阳性率69.0 % (78/113); MMP-7表达与胃癌肿块大小、浸润深度、转移和TNM分期密切相关( $P < 0.05$ ), 而与胃癌的生长方式和分化程度无显著相关性( $P > 0.05$ ); 胃癌组织中MVD与肿块大小、浸润深度、转移和TNM分期关系密切( $P < 0.05$ ), 但与胃癌的组织分化和生长方式无显著相关性( $P > 0.05$ ); 特别是MVD的大小依赖于胃癌组织中MMP-7表达( $P < 0.05$ )。

**结论:** MMP-7在胃癌中表达上调, 可作为揭示胃癌生物学行为的客观指标, 其可能通过参与胃癌的生长、浸润、转移和血管形成而在胃癌的发生和演进中起到重要作用。

孙晋民, 郑华川, 杨雪飞, 辛彦, 张荫昌. 基质金属蛋白酶-7表达与胃癌临床病理生物学行为的关系. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1310-1313  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1310.asp>

## 0 引言

恶性肿瘤的浸润和转移是多步骤、多因素和多阶段的病理过程。基底膜和细胞外基质是阻碍肿瘤浸润和转移的天然屏障, 他们的降解是恶性肿瘤发生浸润和转移的关键环节, 基质金属蛋白酶-7 (MMP-7)的底物是细胞外基质。大量研究发现MMP-7可以降解细胞外基质和刺激血管内皮细胞DNA合成来促进血管形成<sup>[1-4]</sup>, 同时参与Fas配体和肿瘤坏死因子的释放<sup>[5, 6]</sup>。各种肿瘤均表达MMP-7, 如胰腺癌、肝癌、结肠癌、胃癌、口腔鳞癌和子宫内膜癌等, 可见MMP-7表达参与肿瘤发生和演进过程<sup>[2, 7-11]</sup>。一些研究表明肿瘤内的微血管密度

与肿瘤的大小、浸润深度、局部或远处转移密切相关<sup>[12,13]</sup>。胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一<sup>[14-17]</sup>，在中国发病率也居恶性肿瘤的榜首，而大部分胃癌患者最终死于浸润和转移<sup>[18-24]</sup>，因此研究胃癌演进的分子机制是非常必要的。我们观察了MMP-7在胃癌癌旁黏膜和原发灶中的表达，比较其在原发灶中表达与胃癌临床病理特征的关系，探讨MMP-7在胃癌演进中的浸润、转移和血管形成中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集中国医科大学附属第二医院1997-09/2001-02手术治疗胃癌标本113例，其中伴有淋巴结或远隔脏器转移38例，所有患者手术前均未经过放化疗。所有病例的癌旁黏膜和原发灶均经4 g/L 甲醛固定，用石蜡包埋，并制作成4 μm的切片。将切片进行HE染色，并由两位病理医师来确定其病理诊断和组织学特征。S-P试剂盒购于中山生物技术公司，抗MMP-7多抗和抗CD34单克隆抗体分别购于博士德生物技术公司和中山生物技术公司。

**1.2 方法** 胃癌癌旁黏膜和原发灶连续切片用于S-P免疫组织化学染色。MMP-7染色定位在细胞质内。由两位观察者随机选择5个有代表性的视野计数100个细胞，采用盲法确定MMP-7的染色强度。MMP-7在组织中的表达强度分级如下：阳性细胞小于或等于5%为阴性(-)；5-25%为弱阳性(+); 25-50%为阳性(++); 大于或等于50%为强阳性(+++)。另外，利用改良的Weidner法计数微血管密度，具体操作：肿瘤中分布的微血管为血管计数热点，任何棕色的内皮细胞或内皮细胞簇被认为是一个可计数的微血管。观察者在高倍镜下选定5个高倍视野计数(物镜：40×；目镜10×，每个视野的面积为0.1885 mm<sup>2</sup>)，所有病例的微血管密度均由两位研究人员确定并取得一致。

统计学处理 率的比较采用 $\chi^2$ 检验，利用Spearman检验分析等级相关性，方差分析区分不同组的均值。P<0.05视为有统计学意义，所用数据均利用SPSS 10.0统计软件进行处理。

## 2 结果

MMP-7阳性染色定位在细胞质中，在癌旁黏膜上皮细胞中显示低弱表达(29.2%，33/113)，而在间质和基底膜上不见MMP-7染色。研究发现在69.0%胃癌组织中显示强表达(图1)，其阳性率显著高于胃癌旁黏膜(P<0.05， $\chi^2=35.852$ )。胃癌原发灶中MMP-7表达与胃癌肿块大小、浸润深度、转移和TNM分期密切相关(P<0.05)，而与胃癌的组织分化程度无显著相关性(P>0.05)。虽然团块型胃癌中MMP-7表达低于巢型或弥漫型胃癌，但MMP-7表达与胃癌的生长方式无显著相关性(P>0.05，表1)。抗原CD34定位在细胞质或细胞膜上(图2)。胃癌中MVD均值与肿块的大小相关(P<0.05)，肿块大的肿瘤

MVD值高。即使未分化型胃癌中MVD高于分化型(P>0.05)，MVD均值与胃癌的分化无显著相关性。伴有转移的胃癌中MVD高于未发生转移的胃癌(P<0.05)。此外，MVD随着胃癌的TNM分期升高而增大(P<0.05)。特别值得注意的是MVD的大小依赖于MMP-7的表达(P<0.05，表2)。

表1 MMP-7表达与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	MMP-7 表达					相关系数 P 值	
		-	+	++	+++	阳性率(%)		
大小 小于4 cm	47	21	12	11	3	55.3	0.276	0.003
大于或等于4 cm	66	14	18	21	13	78.7		
浸润 黏膜下层以上	26	17	6	3	0	34.6	0.347	0.000
肌层	34	5	13	12	4	85.2		
浆膜下层以下	53	13	11	17	12	75.4		
转移 阴性	75	28	21	19	7	62.6	0.253	0.007
阳性	38	7	9	13	9	81.5		
TNM O	18	11	5	2	0	38.8	0.318	0.007
I	28	8	10	8	2	71.4		
II	40	12	7	12	9	70.0		
III	17	3	5	4	5	82.3		
IV	10	1	3	6	0	90.0		
生长 团块型	23	7	6	7	3	69.5	0.369	0.000
巢型	30	5	9	8	8	83.3		
弥漫型	34	6	9	14	5	81.8		
分型 分化型	53	16	18	12	7	69.8	0.061	0.523
未分化型	60	19	12	20	9	68.3		

表2 MVD与胃癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	MVD(均值±标准差)	F 值	P 值
大小 小于4 cm	47	40.30 ± 24.70	5.682	0.019
大于或等于4 cm	66	51.20 ± 23.44		
浸润 黏膜下层以上	26	31.01 ± 20.23	9.686	0.000
肌层	34	45.72 ± 23.65		
浆膜下层以下	53	54.95 ± 23.34		
转移 阴性	75	41.52 ± 23.06	10.717	0.001
阳性	38	56.82 ± 24.26		
TNM O	18	30.95 ± 21.32	6.250	0.000
I	28	37.51 ± 22.69		
II	40	50.93 ± 21.75		
III	17	62.07 ± 25.26		
IV	10	46.67 ± 24.47		
生长 团块型	23	50.05 ± 21.27	5.182	0.002
巢型	30	52.70 ± 24.84		
弥漫型	34	51.02 ± 24.98		
分型 分化型	53	45.46 ± 24.00	0.173	0.678
未分化型	60	47.57 ± 25.04		
MMP-7 -	35	31.83 ± 19.72	14.740	0.000
+	30	40.50 ± 23.46		
++	32	60.01 ± 17.95		
+++	16	63.99 ± 23.84		

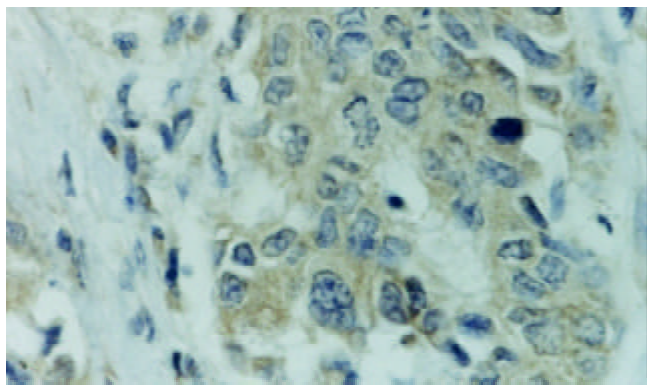


图1 胃癌细胞中 MMP-7 表达呈强阳性, 间质和基底膜中呈阴性 S-P 法  $\times 400$ .

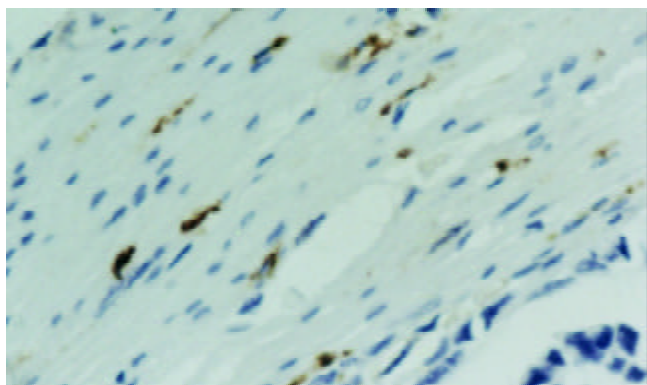


图2 CD34 定位在血管内皮细胞的细胞膜和细胞质中 S-P 法  $\times 400$ .

### 3 讨论

MMP-7 是一种 19 kd 基质裂解素(matrilysin), 为间质溶解素家族成员之一, 其分解底物主要有纤维连接蛋白、IV 胶原、层连蛋白和钙粘素等. MMP-7 除参与胚胎发育、创伤修复、和器官形态发生等组织再生过程, 而且可通过降解细胞外基质和促进毛细血管的增生在肿瘤的浸润和转移等演进过程中重要作用<sup>[25]</sup>.

本组资料中 MMP-7 在 29.3 % 的胃癌旁黏膜中呈阳性表达, 但仍然不可忽视, 因为本组病例中的癌旁黏膜大多伴有肠化生和炎症等病理学变化. 有文献报道 IL-2, IL-8 等炎症因子可使上皮细胞中 MMP-7 表达上调<sup>[26]</sup>. Crawford et al<sup>[26]</sup> 研究发现 MMP-7 和 FasL 在胰腺化生导管上皮细胞中协同表达, 提示 MMP-7 参与胰腺导管化生细胞 FasL 水解, 进而调节导管上皮细胞的凋亡和增生平衡. Yu et al<sup>[27]</sup> 研究结果显示 MMP-7 可以和 CD44、EGF 结合而参与上皮细胞的修复过程. 这些研究均提示 MMP-7 在胃黏膜的修复和再生等生理过程中起重要调节作用.

为了观察 MMP-7 在胃癌组织中的表达, 我们比较了 MMP-7 在胃癌旁黏膜和癌组织中的阳性表达率, 结果发现胃癌中 MMP-7 中表达高于癌旁黏膜, 提示 MMP-7 表达上调参与胃癌发生过程. 此外, 本研究显示即使分化型胃癌中 MMP-7 表达低于与未分化胃癌, 但 MMP-7 表达与胃癌的分化程度无显著相关性, 说明

MMP-7 表达上调是胃癌的普遍现象, 不能反映胃癌的分化程度. 我们也发现 MMP-7 阳性表达与胃癌肿块大小、浸润深度、转移和 TNM 分期密切相关, 由此可推测 MMP-7 可能参与胃癌的生长、浸润和转移等过程. Giatromanolaki et al<sup>[28]</sup> 研究发现 MMP-7 可以水解介导细胞同质性黏附的关键分子 E-cadherin, 进而提高肿瘤细胞运动性和浸润能力, 使肿瘤细胞更具恶性表型. Adachi et al<sup>[25]</sup> 将 MMP-7 cDNA 转染到结肠癌细胞后其浸润和转移能力大大提高. 同时有文献报道 MMP-7 水解其他金属蛋白酶的活化和参与 FasL、肿瘤坏死因子释放<sup>[5, 6]</sup>. 因此 MMP-7 可能通过水解细胞外基质、参与免疫逃逸和提高细胞运动能力等方面参与胃癌细胞的演进过程.

血管形成是肿瘤生长、浸润和转移所必需的, 肿瘤和宿主相互作用产生的肿瘤血管形成因子(如血管内皮生长因子和 MMP-7)可刺激肿瘤新生血管形成<sup>[28]</sup>. 我们发现胃癌中 MVD 均值与胃癌的肿块大小、浸润深度和转移密切相关, 如文献<sup>[29]</sup>报道一致, 提示血管形成在肿瘤的生长、浸润和转移中起到重要作用. 此外, MMP-7 表达越高, MVD 均值越大. 目前, 大量研究表明血管形成为三个步骤: (1) 血管内皮细胞增生; (2) 细胞外基质降解; (3) 内皮细胞运动<sup>[30]</sup>. 而 MMP-7 在新生血管形成的过程中均起到相当的作用, 是肿瘤血管形成得重要促进因子. 本研究结果提示 MMP-7 可能通过参与血管形成而在胃癌生长、浸润和转移等生物学过程中起重要作用.

总之, 我们的结果显示 MMP-7 表达在肿块大、浸润深、发生转移和 TNM 分期高的胃癌中高表达, MVD 均值在肿块大、浸润深、发生转移和 TNM 分期高的胃癌中高, 并且 MDV 均值大小依从于 MMP-7 表达. 因此, 我们建议 MMP-7 是反映胃癌生物学行为的客观指标, 因为其参与胃癌生长、浸润、转移、演进和血管形成过程. 此外, 利用体内实验证明 MMP-7 在促进血管形成过程中遗传学机制和其在肿瘤免疫逃逸机制中的作用是十分必要的.

### 4 参考文献

- 1 Davies G, Jiang WG, Mason MD. Matrilysin mediates extracellular cleavage of E-cadherin from prostate cancer cells: a key mechanism in hepatocyte growth factor/scatter factor-induced cell-cell dissociation and in vitro invasion. *Clin Cancer Res* 2001;7:3289-3297
- 2 Bair EL, Massey CP, Tran NL, Borchers AH, Heimark RL, Cress AE, Bowden GT. Integrin- and cadherin-mediated induction of the matrix metalloprotease matrilysin in cocultures of malignant oral squamous cell carcinoma cells and dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 2001;270:259-267
- 3 Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawa T, Kamiyama M, Hasegawa S, Momiyama N, Miyazaki K, Shimada H. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo. *Cancer Lett* 2001;173:175-182
- 4 Huo N, Ichikawa Y, Kamiyama M, Ishikawa T, Hamaguchi Y, Hasegawa S, Nagashima Y, Miyazaki K, Shimada H. MMP-7 (matrilysin) accelerated growth of human umbilical vein endothelial cells. *Cancer Lett* 2002;177:95-100



- 5 Vargo-Gogola T, Crawford HC, Fingleton B, Matrisian LM. Identification of novel matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) cleavage sites in murine and human Fas ligand. *Arch Biochem Biophys* 2002;408:155-161
- 6 Mitsiades N, Yu WH, Poulaki V, Tsokos M, Stamenkovic I. Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res* 2001;61:577-581
- 7 Nakamura H, Horita S, Senmaru N, Miyasaka Y, Gohda T, Inoue Y, Fujita M, Meguro T, Morita T, Nagashima K. Association of matrilysin expression with progression and poor prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2002;9:751-755
- 8 Liu XP, Oga A, Suehiro Y, Parks WC. Inverse relationship between matrilysin expression and proliferative activity of cells in advanced gastric carcinoma. *Hum Pathol* 2002;33:741-747
- 9 Zeng ZS, Shu WP, Cohen AM, Guillem JG. Matrix metalloproteinase-7 expression in colorectal cancer liver metastases: evidence for involvement of MMP-7 activation in human cancer metastases. *Clin Cancer Res* 2002;8:144-148
- 10 Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Yotsumoto H, Hara T, Kajihara S, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Involvement of the Ets-1 gene in overexpression of matrilysin in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:6519-6525
- 11 Ueno H, Yamashita K, Azumano I, Inoue M, Okada Y. Enhanced production and activation of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human endometrial carcinomas. *Int J Cancer* 1999;84:470-477
- 12 Tenderenda M, Rutkowski P, Jesionek-Kupnicka D, Kubiak R. Expression of CD34 in gastric cancer and its correlation with histology, stage, proliferation activity, p53 expression and apoptotic index. *Pathol Oncol Res* 2001;7:129-134
- 13 Sanz-Ortega J, Steinberg SM, Moro E, Saez M, Lopez JA, Sierra E, Sanz-Esponera J, Mcrino MJ. Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFR as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol* 2000;15:455-462
- 14 Yin T, Ji XL, Shen MS. Relationship between lymph node sinuses with blood and lymphatic metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:40-43
- 15 Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:35-39
- 16 Jiang YA, Zhang YY, Luo HS, Xing SF. Mast cell density and the context of clinicopathological parameters and expression of p185, estrogen receptor, and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1005-1008
- 17 Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:994-998
- 18 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 19 Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- 20 Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 21 Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:586-590
- 22 Niu WX, Qin XY, Liu H, Wang CP. Clinicopathological analysis of patients with gastric cancer in 1200 cases. *World J Gastroenterol* 2001;7:281-284
- 23 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 24 Jiang BJ, Sun RX, Lin H, Gao YF. Study on the risk factors of lymphatic metastasis and the indications of less invasive operations in early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:553-556
- 25 Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Arimura Y, Nishi M, Endo T, Imai K. Clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression at the invasive front in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 2001;95:290-294
- 26 Crawford HC, Scoggins CR, Washington MK, Matrisian LM, Leach SD. Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin Invest* 2002;109:1437-1444
- 27 Yu WH, Woessner JF Jr, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev* 2002;16:307-323
- 28 Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Stathopoulos GP, Kapsoritakis A, Paspatis G, Kakolyris S, Sivridis E, Georgoulas V, Harris AL, Gatter KC. Angiogenic interactions of vascular endothelial growth factor, of thymidine phosphorylase, and of p53 protein expression in locally advanced gastric cancer. *Oncol Res* 2000;12:33-41
- 29 Cristofanilli M, Charnsangavej C, Hortobagyi GN. Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:415-426
- 30 Cox G, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinases and cancer. *Anticancer Res* 2001;21:4207-4219

# 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联

叶梅, 刘君炎, 邓长生

叶梅, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071  
刘君炎, 武汉大学医学院免疫学教研室 湖北省武汉市 430071  
叶梅, 女, 1970-12-16生, 重庆市人, 汉族, 2001年武汉大学医学院硕士, 现武汉大学中南医院消化内科博士生, 主要从事消化道肿瘤和炎症性肠病的研究。湖北省卫生科技基金资助课题, No. WJ01572  
项目负责人: 邓长生, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科。yemei1970@hotmail.com  
电话: 027-67813247 传真: 027-87330532  
收稿日期: 2003-04-03 接受日期: 2003-05-16

## Relationship between xenobiotic-metabolizing enzyme gene polymorphisms and genetic susceptibility of gastric cancer

Mei Ye, Jun-Yan Liu, Chang-Sheng Deng

Mei Ye, Jun-Yan Liu, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China  
Supported by the Health Science and Technology Fund of Hubei Province, No. WJ01572  
Correspondence to: Dr. Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. yemei1970@hotmail.com  
Received: 2003-04-03 Accepted: 2003-05-16

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between genetic polymorphisms of CYP2E1 and GSTT1 and gastric cancer.

**METHODS:** Fifty six patients with histologically confirmed gastric adenocarcinoma (GC case group) and 56 healthy persons (control group), matched by age, sex, smoking, dietary habits and family history of cancer were studied. Genomic DNA samples were assayed for restriction fragment length polymorphisms in the CYP2E1 by PCR amplification followed by digestion with endonuclease PstI, and GSTT1 genes were detected by multiplex PCR.

**RESULTS:** The frequency of CYP2E1 C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> genotype was 69.6 % in GC group and 46.4 % in control group, with a statistically significant difference ( $\chi^2=6.27$ ;  $P<0.05$ , OR=1.915, 95 % CI=1.051-3.489). The frequency of GSTT1 null genotype was higher in GC group (60.7%) than in control group (46.4 %), but the difference was not statistically significant ( $\chi^2=2.30$ ;  $0.1<P<0.25$ ,  $P=1.783$ , 95 % CI=0.842-3.777). Furthermore, a joint effect of the CYP2E1 and GSTT1 genotypes on cancer risk was observed. GSTT1 non-null genotype/C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> or C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> genotype was lower than that in GC group ( $\chi^2=6.23$ ;  $0.01<P<0.025$ ,  $P=0.302$ , 95 % CI=0.114-0.796). The GSTT1 null genotype/C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> genotype in GC group was significantly higher than that in the other groups ( $\chi^2=3.98$ ;  $P<0.05$ ,  $P=2.250$ , 95 % CI=1.007-5.026).

**CONCLUSION:** CYP2E1 C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> genotype is associated with gastric cancer and individuals who carry the C<sub>1</sub> allele have

a higher risk of developing GC than those with the C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> or C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> genotype. GSTT1 null genotype does not increase the risk of GC. Combined analysis of polymorphisms has shown that GSTT1 non-null genotype/C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> or C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub> genotype is protective factor of GC and GSTT1 null genotype/C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> genotype is a risk factor of GC. That is, individuals with both GSTT1 null genotype and CYP2E1 C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> genotype have a greater risk of GC.

Ye M, Liu JY, Deng CS. Relationship between xenobiotic-metabolizing enzyme gene polymorphisms and genetic susceptibility of gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1314-1317

## 摘要

**目的:** 探讨 CYP2E1 PstI 多态与 GSTT1 空白基因型与胃癌的关联。

**方法:** 胃癌患者 56 例及健康人对照 56 名, 分别采用 PCR-RFLP 技术与多重 PCR 方法, 检测 CYP2E1 基因型和 GSTT1 空白基因型。

**结果:** CYP2E1 C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> 基因型在胃癌组和健康人对照组中的分布频率分别是 69.6 % 和 46.4 %, 差异具有显著性 ( $\chi^2=6.27$ ;  $P<0.05$ ); GSTT1 空白基因型在胃癌和健康人中的分布频率分别为 60.7 % 和 46.4 %, 在胃癌中分布频率较高, 但未具有统计学意义 ( $\chi^2=2.30$ ;  $0.1<P<0.25$ ); CYP2E1 基因与 GSTT1 基因联合分析, 结果显示 GSTT1 空白基因型/CYP2E1(C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>) 基因联合型在胃癌中的分布频率显著高于其他基因联合型, 差异具有统计学意义 ( $\chi^2=3.98$ ;  $0.025<P<0.05$ )。

**结论:** CYP2E1 C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> 基因型与胃癌遗传易感性相关; GSTT1 空白基因型不增加胃癌的危险性; 基因之间具有联合作用, GSTT1 非空白基因型/CYP2E1(C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub> 或 C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>) 基因联合是胃癌的保护因素, GSTT1 空白基因型/CYP2E1(C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>) 基因联合是胃癌的危险因素, 即同时具有 GSTT1 空白基因型及 CYP2E1 C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub> 基因型的个体罹患胃癌的危险性显著增加。

叶梅, 刘君炎, 邓长生. 毒物代谢酶基因多态与胃癌的关联. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1314-1317  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1314.asp>

## 0 引言

近年来, 环境因素在胃癌病因中的作用受到重视, 尤其是亚硝胺与胃癌的发病有关。但个体对肿瘤的易感性因人而异, 其中毒物代谢酶的遗传多态现象是研究肿瘤遗传易感性的重要方面。细胞色素 P450 家族(cytochrome P450, CYP)和谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-

transferase, GST)是体内重要的I相酶和II相酶. 毒物代谢酶受遗传控制, 具有广泛多态性, 基因多态影响蛋白表达, 引起酶的活性改变. 对外界致癌物的代谢能力改变, 在一定程度上决定了机体患肿瘤危险性的差异<sup>[1]</sup>. 但在研究CYP2E1及GSTT1基因多态与肿瘤的关联时, 结论并非一致. 我们采用分子生物学技术, 检测胃腺癌患者CYP2E1 PstI多态及GSTT1空白基因型的分布频率, 探讨CYP2E1 PstI多态及GSTT1空白基因型与胃腺癌的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 武汉大学中南医院及湖北省肿瘤医院业经胃镜活检和(或)手术标本病理诊断为胃腺癌患者56例, 男42例, 女14例, 年龄22-79(平均57.6岁). 对照组56名, 为同期在武汉大学中南医院体检的无血缘关系的健康人56名, 男39名, 女17名, 年龄26-86(平均58.0岁), 其性别、年龄等因素与胃癌组配比相似. 研究对象均为湖北地区汉族人, 收集研究对象的职业、籍贯、饮食习惯、吸烟、饮酒及家族史等. 三磷酸脱氧核糖核苷酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP四种)、Taq DNA聚合酶、PCR反应缓冲液和MgCl<sub>2</sub>均为Promega生物有限公司产品; 限制性内切酶Pst I及相应的缓冲液和DNA分子质量Markers为华美生物工程公司产品; 参照GeneBank的DNA序列分别设计CYP2E1, GSTT1和 $\beta$ -globin(作内参照)基因扩增引物, 均由加拿大上海生物工程公司合成(PAGE纯化). PCR扩增仪为珠海HeMa-240型.

**1.2 方法** 研究对象均于清晨空腹取静脉血1 mL(分作2份, 1份备用), EDTA·Na<sub>2</sub>抗凝, 胃腺癌患者于放化疗前采血. 碘化钠法提取DNA, 加TE缓冲液溶解DNA后用20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定, -20℃保存备用.

CYP2E1基因分型 其引物序列为5'-CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA-3'和5'-TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG-3'. PCR反应体系总体积为50  $\mu$ L, 内含DNA模板2  $\mu$ L(0.1-0.5  $\mu$ g), 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5  $\mu$ L, 50  $\mu$ mol/L引物1  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTP 5  $\mu$ L和相应的缓冲液. 用优质石蜡油30  $\mu$ L封盖, 95℃预变性8 min后加入Taq DNA酶2  $\mu$ L, 按94℃ 45 s、55℃ 45 s、72℃ 60 s运行35个循环, 72℃延伸8 min. 用80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳检测PCR产物, 其扩增片段为410 bp. 取PCR扩增产物10  $\mu$ L, 用限制性内切酶Pst I 37℃恒温水浴箱内消化18 h, 65℃ 15 min终止反应. 取酶切产物用80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分析其基因型.

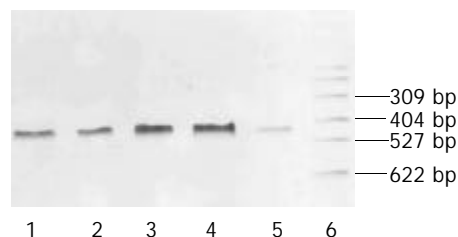
GSTT1基因检测 其引物序列为GSTT1-1: 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3' GSTT1-2: 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3',  $\beta$ -globin B<sub>1</sub>: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3',  $\beta$ -globin B<sub>2</sub>: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'. PCR反应总体积为50  $\mu$ L, 内含模板4  $\mu$ L, 10  $\times$  Buff缓冲液5  $\mu$ L, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L, 2 mmol/L dNTP 5  $\mu$ L, TaqDNA

酶2.5  $\mu$ L, GSTT1-1, GSTT1-2,  $\beta$ -globin B<sub>1</sub>和 $\beta$ -globin B<sub>2</sub>各2  $\mu$ L, 加双蒸水至总体积50  $\mu$ L, 用石蜡油30  $\mu$ L封盖, 97℃预变性8 min, 按95℃ 45 s, 57℃ 45 s, 72℃ 60 s, 30个循环, 72℃延伸8 min. PCR产物用50 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳分析其基因型.

统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件进行 $\chi^2$ 检验, 以P<0.05确定为有统计学意义.

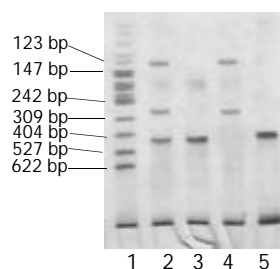
## 2 结果

从胃癌患者和健康人对照组的外周血提取DNA为模板, 采用PCR-RFLP技术及多重PCR方法进行CYP2E1, GSTT1基因分型. CYP2E1基因的DNA样品, 经PCR扩增后, DNA产物为410 bp一条带(图1), 经PstI酶切后产生了3种不同的基因型: 纯合子野生型(C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>), 纯合子突变型(C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>)及杂合子(C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>)(图2); GSTT1非空白基因型的DNA样品, 经多重PCR扩增后( $\beta$ -globin为内参照), DNA产物为268 bp和480 bp两条带, GSTT1空白基因型则只有268 bp一条带(为 $\beta$ -globin扩增产物)(图3). 因此, 非空白基因型包括有2个基因拷贝的纯合子和仅有一个基因拷贝的杂合子, 而空白基因型则为纯合子基因缺乏.



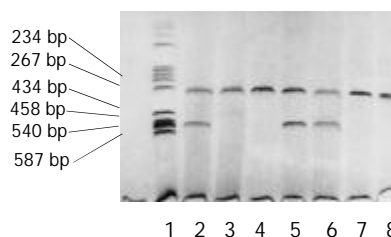
1-5: 研究对象(胃癌和对照者)的PCR扩增产物; 6: DNA marker pBR322DNA/MspI.

图1 CYP2E1基因PCR扩增产物的PAGE图谱.



1: DNA marker pBR322DNA/MspI; 2: C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>基因型; 3, 5: C<sub>1</sub>/C<sub>1</sub>基因型; 4: C<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>基因型.

图2 CYP2E1基因PCR-RFLP酶切后(Pst I), PAGE图谱.



1: pBR322/Hae III DNA分子marker; 2, 5, 6: GSTT1非空白基因型; 3, 4, 7, 8: GSTT1空白基因型.

图3 GSTT1基因,  $\beta$ -globin基因PCR扩增产物的PAGE图谱.

2.1 CYP2E1 基因型的分布 在胃癌患者、健康人中, CYP2E1 基因型  $C_1/C_1$ ,  $C_1/C_2$ ,  $C_2/C_2$  分别为 69.6 %, 23.2 %, 7.1 % 和 46.4 %, 42.9 %, 10.7 %。两组相比,  $\chi^2=6.27$ ,  $P=0.043$ ,  $OR=1.915$ , 95 %  $CI=1.051-3.489$ 。  $C_1/C_1$  基因型在健康人对照组及胃癌组的分布频率高于  $C_1/C_2$  及  $C_2/C_2$  基因型个体, 二者差异有显著性。

2.2 GSTT1 空白基因型的分布在胃癌、健康人中, GSTT1 空白基因型为 60.7 % 和 46.4 %; GSTT1 非空白基因型为 39.3 % 和 53.6 %。 GSTT1 空白基因型在胃癌中的分布频率较高, 但尚未有统计学意义( $\chi^2=2.30$ ,  $P=1.783$ , 95 %  $CI=0.842-3.777$ ), 提示 GSTT1 空白基因型并不增加胃癌的危险性, 即 GSTT1 空白基因型与胃癌易感性无关。

2.3 CYP2E1, GSTT1 基因联合型与胃癌易感性 基因之间可能存在联合作用。鉴此, 我们进一步分析 CYP2E1 与 GSTT1 各种基因联合与胃癌的关系。结果表明, 在胃癌组, GSTT1 非空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_2$  或  $C_2/C_2$ ) 基因型频率为 12.5 % (7/56), GSTT1 空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_2$  或  $C_2/C_2$ ) 基因型频率为 17.9 % (10/56), GSTT1 非空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_1$ ) 基因型频率为 26.8 % (15/56), GSTT1 空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_1$ ) 基因型频率为 42.8 % (24/56)。在健康人分别为 32.1 % (18/56), 21.4 % (12/56), 21.4 % (12/56), 25.0 % (14/56)。将每一种基因联合型分别视为暴露因素, 与其他基因联合型进行对照分析, 结果显示 GSTT1 非空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_2$  或  $C_2/C_2$ ) 基因联合型在胃癌中的分布频率显著低于其他基因联合型, 说明发生胃癌的危险性显著降低( $\chi^2=6.23$ ,  $0.01 < P < 0.025$ ), GSTT1 空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_2$  或  $C_2/C_2$ ) 和 GSTT1 非空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_1$ ) 基因联合型在胃癌分布与健康人相比差异无显著性( $\chi^2=0.23$ ,  $0.5 < P < 0.75$ ), 而 GSTT1 空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_1$ ) 基因联合型在胃癌中的分布频率显著高于其他基因联合型, 差异具有统计学意义( $\chi^2=3.98$ ,  $0.025 < P < 0.05$ )。即 GSTT1 空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_1$ ) 基因联合型个体发生胃癌的危险性, 是其他基因联合型个体的 2.25 倍, 提示 GSTT1 非空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_2$  或  $C_2/C_2$ ) 基因联合型是胃癌的保护因素, 而 GSTT1 空白基因/CYP2E1 ( $C_1/C_1$ ) 基因联合则是胃癌的危险因素, 分析单基因在基因联合中的作用, CYP2E1 基因型可能更重要。

### 3 讨论

肿瘤的发生是多病因多步骤的过程。多数人类肿瘤来源于复杂的突变事件, 是个体内在因素和环境中的致癌剂共同作用的结果。与胃癌相关的外界致癌物主要是亚硝胺类致癌物。动物实验表明, 亚硝胺可诱导实验动物发生口腔、食管、鼻咽、前胃、肝脏、肺等的肿瘤。CYP2E1 PstI 基因多态与 GSTT1 空白基因型影响酶的表达及活性, 对亚硝胺类外界致癌物、致突变物代谢能力下降, 机体对肿瘤易感性增加。本结果提示, CYP2E1  $C_1/C_1$

$C_1$  基因型在胃腺癌中的分布频率显著高于  $C_1/C_2$  及  $C_2/C_2$  基因型,  $C_1/C_1$  基因型个体患胃腺癌的危险性比至少携带一个  $C_2$  等位基因的个体增加 2.65 倍。一些学者研究发现  $C_1/C_1$  基因型与食管癌<sup>[2]</sup>、肺癌<sup>[3]</sup>危险性相关。Le Marchand et al<sup>[4]</sup> 研究 CYP2E1 基因型与表型的关系时, 发现 CYP2E1  $C_2/C_2$  基因型个体的 CYP2E1 酶活性较  $C_1/C_1$  型或  $C_1/C_2$  型个体显著降低, 进一步说明 CYP2E1  $C_1/C_1$  基因型是肿瘤易感基因。但也有持异议者。Wu et al<sup>[5]</sup> 发现台湾胃癌患者中  $C_2/C_2$  基因型的分布频率较健康人对照有显著差异。Nishimoto et al<sup>[6]</sup> 研究日裔巴西人胃癌患者时, 显示  $C_1$  基因可降低胃癌危险, 在弥散型胃癌中,  $C_2$  等位基因分布更普遍。Kiss et al<sup>[7]</sup> 研究认为 CYP2E1  $C_2/C_2$  基因型与结肠癌危险性相关。也有报道认为 CYP2E1 基因型与器官特异性肿瘤如肝癌<sup>[8]</sup>、胃癌<sup>[9]</sup>、肠癌<sup>[10]</sup>、肺癌<sup>[11]</sup> 等无关。

GSTT1 空白基因型与肿瘤之间的关系尚有争议。德国学者 Bruhn et al<sup>[12]</sup> 研究 GSTT1 基因型与表型的关系, 认为 GSTT1 酶活性最高的为纯合子野生型, 中等的为杂合子, 活性最低的则为 GSTT1 空白基因型。芬兰报道, 单独的 GSTM1、GSTT1 基因多态与肺癌无关, 而 GSTM1/GSTT1 空白基因联合时, 则增加鳞状细胞癌危险性<sup>[13]</sup>, 是其他基因联合型的 2 倍, 且肺癌与中等度吸烟(小于 15 支/d)相关, 与重度吸烟(大于 15 支/d)无关联。另外, 文献还报道 GSTT1 空白基因型增加了大肠癌、膀胱癌的危险性<sup>[14, 15]</sup>。台湾学者 Sun et al<sup>[16]</sup> 报道 GSTT1 空白基因型的慢性乙肝病毒表面抗原携带者, 黄曲霉素作为暴露因素, 发展为肝细胞癌的危险性较 GSTT1 非空白基因型的对照组显著增加。GSTT1 与胃癌的关联尚有争议。Setiawan et al<sup>[17]</sup> 研究中国 143 例胃癌患者, 166 例慢性胃炎及 433 例对照人群, 发现 GSTT1 空白基因型与胃癌危险性相关( $OR=2.5$ , 95 %  $CI=1.01-6.22$ ), 与慢性胃炎无关。但 Saadat et al<sup>[18]</sup> 研究则认为 GSTT1 基因型并不增加胃癌和肠癌的危险性, 但同时携带 GSTT1 和 GSTM1 空白基因型则增加了患胃肠癌风险。本研究中胃癌组、健康人组在吸烟、饮食习惯、家族史等因素无显著差异, GSTT1 空白基因在胃癌和健康人中的分布频率分别为 60.7 % 和 46.4 %, 差异无统计学意义, 故尚无依据认为 GSTT1 空白基因型为胃癌的易感基因。

外界致癌物在体内的代谢依赖 I 相酶和 II 相酶的共同作用, 在研究代谢酶与肿瘤的关系时, 有必要进行基因联合分析。本结果显示, GSTT1 空白基因型/CYP2E1  $C_1/C_1$  型的个体患胃癌的危险性显著增加, 是其他基因联合型的 2.25 倍。GSTT1 非空白基因型/CYP2E1 ( $C_1/C_2$  及  $C_2/C_2$ ) 型的个体患胃癌的风险较其他基因型个体显著降低, 差异有显著性, 提示同时具有 CYP2E1  $C_1/C_1$  基因及 GSTT1 空白基因型个体为胃癌高危人群。外界致癌物进入体内后, 被具有较高活性的 I 相酶 CYP2E1 活化达到最大致癌效应, 而 GSTT1 空白基因型不能有效



地表达 GSTT1, 酶活性下降或缺乏, 不能将 I 相酶代谢活化后形成的亲电子复合物即前致癌物降解排出体外, 导致合成 DNA 加成物, 染色体畸变, 形成肿瘤. 单独的 GSTT1 空白基因型并不增加患癌危险, 提示基因联合作用有时在肿瘤的发生过程中更重要.

#### 4 参考文献

- Hirvonen A. Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environ Health Perspect* 1999;107(Suppl 1):37-47
- Tan W, Song N, Wang GQ, Liu Q, Tang HJ, Kadlubar FF, Lin DX. Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferases M1, T1, and P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:551-556
- Li ZS, Tan W, Shao K, Zhang L, Lin DX. Susceptibility to lung cancer in Chinese is associate with genetic polymorphism in cytochrome P4502E1. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2000;22:5-7
- Le Marchand L, Wilkinson GR, Wilkens LR. Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:495-500
- Wu MS, Chen CJ, Lin MT, Wang HP, Shun CT, Sheu JC, Lin JT. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2E1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to gastric carcinoma in Taiwan. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:338-343
- Nishimoto IN, Hanaoka T, Sugimura H, Nagura K, Ihara M, Li XJ, Arai T, Hamada GS, Kowalski LP, Tsugane S. Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:675-680
- Kiss I, Sandor J, Pajkos G, Bogner B, Hegedus G, Ember I. Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes. *Anticancer Res* 2000;20:519-522
- Wong NA, Rae F, Simpson KJ, Murray GD, Harrison DJ. Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. *Mol Pathol* 2000;53:88-93
- Tsukino H, Kuroda Y, Qiu D, Nakao H, Imai H, Katoh T. Effects of cytochrome P450 (CYP) 2A6 gene deletion and CYP2E1 genotypes on gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2002;100:425-428
- Butler WJ, Ryan P, Roberts-Thomson IC. Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:631-635
- Quinones L, Lucas D, Godoy J, Caceres D, Berthou F, Varela N, Lee K, Acevedo C, Martinez L, Aguilera AM, Gil L. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett* 2001;174:35-44
- Bruhn C, Brockmoller J, Kerb R, Roots I, Borchert HH. Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase theta (GSTT1). *Biochem Pharmacol* 1998;56:1189-1193
- Saarikoski ST, Voho A, Reinikainen M, Anttila S, Karjalainen A, Malaveille C, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K, Hirvonen A. Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. *Int J Cancer* 1998;77:516-521
- Laso N, Lafuente MJ, Mas S, Trias M, Ascaso C, Molina R, Ballesta A, Rodriguez F, Lafuente A. Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1)-dependent risk for colorectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3399-3403
- Salagovic J, Kalina I, Habalova V, Hrivnak M, Valansky L, Biros E. The role of human glutathione S-transferases M1 and T1 in individual susceptibility to bladder cancer. *Physiol Res* 1999;48:465-471
- Sun CA, Wang LY, Chen CJ, Lu SN, You SL, Wang LW, Wang Q, Wu DM, Santella RM. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases M1 and T1 associated with susceptibility to aflatoxin-related hepatocarcinogenesis among chronic hepatitis B carriers: a nested case-control study in Taiwan. *Carcinogenesis* 2001;22:1289-1294
- Setiawan VW, Zhang ZF, Yu GP, Li YL, Lu ML, Tsai CJ, Cordova D, Wang MR, Guo CH, Yu SZ, Kurtz RC. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a Chinese population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:73-80
- Saadat I, Saadat M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancers. *Cancer Lett* 2001;169:21-26

# 胃癌中医证型相关基因的表达谱

刘 莺, 李俊军, 朱文锋, 刘 平

刘莺, 刘平, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 200032  
李俊军, 湖南肿瘤医院病理科 湖南省长沙市 410007  
朱文锋, 湖南中医学院中医诊断研究所 湖南省长沙市 410007  
刘莺, 女, 1961-11-07 生, 湖南省宁乡人汉族, 上海中医药大学博士后, 主要从事中医证规范化研究。  
项目负责人: 刘莺, 200032, 上海市零陵路 530 号, 上海中医药大学肝病研究所. liuluowa@sohu.com  
电话: 021-54231169 传真: 021-64036889  
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

## Gastric cancer related gene expression spectrum in disease pattern of traditional Chinese medicine

Ying Liu, Jun-Jun Li, Wen-Feng Zhu, Ping Liu

Ying Liu, Ping Liu, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China  
Jun-Jun Li, Hunan Hospital of Tumor Diseases, Changsha 410007, Hunan Province, China  
Wen-Feng Zhu, Institute of Diagnostics of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China  
Correspondence to: Ying Liu, 530 Lingling Road, Shanghai, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. liuluowa@sohu.com  
Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-28

## Abstract

**AIM:** To find difference in gene expression pedigree of gastric carcinoma tissue and different syndrome, and its significance in the exploration of the syndrome typ and diagnosis of gastric carcinoma, with gene diagnosis as well as the use of drugs in its treatment.

**METHODS:** The gene expression in two TCM syndrome types of gastric carcinoma due to internal stagnancy of pathogenic heat and stagnancy of qi and blood stasis, respectively, including 4 human gastric carcinoma tissues and normal embryo stomach tissue, was analyzed by using 4096 pieces of human full-length genic CDNA expression CMOS chip technology.

**RESULTS:** The gene expression in the two TCM syndrome types of gastric carcinoma was decreased in their immune associated genes, but increased in cancer-associated genes. Gene expression in the interior stagnancy of toxic heat showed that the body resistance was not weakened, suggesting that there was no deficiency of qi and stagnancy of blood stasis

**CONCLUSION:** The change in gene expression of gastric cancer is identical, but the gene expression spectrum is different in different types of TCM syndromes.

Liu Y, Li JJ, Zhu WF, Liu P. Gastric cancer related gene expression spectrum in disease pattern of traditional Chinese medicine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1318-1321

## 摘要

**目的:** 寻找不同胃癌证型组织中的相关基因表达谱差异表达, 对研究胃癌证型实质进行探讨、胃癌的中医证的基因诊断及指导临床用药有重大的意义。

**方法:** 我们运用含有 4 096 条人类全长基因的 cDNA 表达芯片技术, 对胃癌中医证型邪热内蕴证和气滞血瘀证共 4 例, 胃癌组织及胎胃正常组织基因表达进行了分析。

**结果:** 两证型都有免疫相关基因的下降, 也有癌基因的上调, 但热毒内蕴亚型基因表达提示了正气未虚, 尚有防御能力, 如 nm23 基因增高, P<sup>18</sup> 基因表达增高; 而气虚夹瘀亚型中则无此改变。

**结论:** 胃癌患者的基因表达既有相同表达改变, 也有不同中医证型的基因谱表达改变也不相同, 基因表达谱可为中医的证型提供科学依据。

刘莺, 李俊军, 朱文锋, 刘平. 胃癌中医证型相关基因的表达谱. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1318-1321

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1318.asp>

## 0 引言

人类基因组计划的实现给中医现代化带来了新的机遇<sup>[1]</sup>。基因组学研究方法与中医学的整体观、辨证观有许多相似之处, 一种疾病可能由于多个基因改变所致, 而同一种基因有不同表达状态可能导致多种疾病<sup>[2]</sup>; 反映出基因组学与中医学两个学科在思维方法上的趋近特征, 为中医病证实质性突破提供了条件。肿瘤在不同的个体、不同的病理类型中其生长、浸润、转移是不同的, 这一点与中医证的形成有某些相通之处<sup>[3]</sup>。他们都是依赖有特异编码的基因产物起作用, 正是由于这种基因的微小异常, 决定其生物行为出现极大的变化<sup>[4]</sup>。因此, 运用基因芯片技术寻找不同证型胃癌组织中的相关基因表达谱差异表达, 对研究胃癌证型的实质, 胃癌的中医证的基因诊断及指导临床用药有重大的意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 上海博星公司的基因表达谱芯片上一共有 4 096 个点, 其中设有几个阴性对照: 水稻 U2RNA 基因(8 个点)、HCV 外壳蛋白基因(8 个点), 空白点样液(32 个点)。芯片所用的 4 000 个靶基因 cDNA 克隆, 来自博星公司及合作伙伴。以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 引

物为 1 000-3 000 bp (少数例外), PCR 反应及产物提纯采用标准方法<sup>[5]</sup>, 通过琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物质量, 靶基因溶解于  $3 \times \text{SSC}$  溶液中, 用 Cartesian 公司的 7 500 点样仪及 Tele Chem 公司的硅烷化玻片进行点样, 点样玻片经水合(2 h)室温干燥(30 min)UV 交联(能量设定 65 ml/cm), 再分别用 2 g/LSDS、水及 2 g/L 硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用. 胃癌组织标本 4 例, 是湖南省肿瘤医院 2001-03 行标准胃癌切除手术切除的胃癌标本. 例 1: 男, 23 岁. 胃癌组织类型为低分化腺癌, 浸入胃壁全层, 有近处淋巴转移. 例 2: 男, 35 岁. 胃癌组织类型为中分化腺癌, 浸入胃壁全层, 有近处淋巴转移. 例 3: 女, 30 岁. 胃癌组织类型为低分化腺癌, 浸入胃壁深肌层, 有近处淋巴转移. 例 4: 男, 63 岁. 胃癌组织类型为低分化腺癌, 部份黏液癌, 浸入胃壁全层, 有近处淋巴转移. 经对胃癌术前患者症状进行聚类与主成分分析显示, 例 1-2 为邪热内蕴证中的热毒内蕴兼气虚亚型; 3-4 为气滞血瘀证中的气虚夹瘀亚型. 对照组取自发育正常的流产胎胃. 分别于标本切除后立即液氮保存.

**1.2 方法** 总 RNA 抽提方法参考 Chomczynski et al (Anal Biochem 1987; 163: 156) 提出的步法加以改进: 将液氮保存的胃癌组织和胎胃放在 100 mm 陶瓷碾钵内, 分别彻底碾碎成粉末, 加入溶液 D 和 10 g/L 巯基乙醇匀浆成溶液, 离心后上清液经 1:1 的酸性酚-氯仿两次抽提后, 再经 NaAc 和 5:1 酸性酚-氯仿抽提, 再经等体积异丙醇沉淀; 离心后用 Mili-Q 溶解沉淀, 紫外分析, 用 LiCl 沉淀方法纯化后, 紫外分析及电泳检测显示获得了高质量的纯净 mRNA. 用 Oligotex Mrna (Quagen 公司) 纯化 mRNA 参照 Schena R 方法转录标记 cDNA 并纯化, 用 Cy3-dUTP 标记正常组织 mRNA, 用 Cy5-dUTP 标记癌组织 mRNA. 乙醇沉淀后, 溶解在  $20 \mu\text{l } 5 \times \text{SSC}+2\text{g/L SDS}$  杂交液中. 将 cDNA 微矩阵和杂交探针分别在  $95^\circ\text{C}$  水浴中变性 5 min, 将探针加在 cDNA 微矩阵上用玻片封片, 置于  $60^\circ\text{C}$  杂交 15-17 h, 然后揭开玻片, 分别用  $2 \times \text{SSC}+2\text{g/L SDS}$ ,  $1\text{g/L } \times \text{SSC}+2\text{g/L SDS}$ ,  $1\text{g/L } \times \text{SSC}$  洗涤 10 min, 室温晾干. 芯片的扫描来自 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描仪, 分析软件为 Biodiscovery 公司的 ImaGene 3.0 和博星公司开发的 ArrayGene 1.0.

**统计学处理** 40 个管家基因作参照, 对原始数据进行标准化处理, 剔除 Cy3 和 Cy-5 中信号强度均小于 400 的基因表达数据. 基因显著性差异表达的判定标准为: Ratio 大于 2 或 Ratio 小于 0.5 (Ratio =  $\text{Cy5}/\text{Cy3}$ ). 同时要求筛选出的基因数据在所有样本中均能重复

## 2 结果

**2.1 基因表达图谱** 图 1-4 为基因表达谱的散点图, 每一个点都代表一个基因, X 轴和 Y 轴分别以 Cy3 的荧光强度值(前景值 - 背景值)和  $\text{Cy5}_{(1-4)}$  荧光强度值为坐标, 每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号; 数据

若为红色则代表 X 值与 Y 值的比值在 0.5-2.0 之间, 基本属非特异表达; 数据若为黄色则代表 X 值与 Y 值的比值在 0.5-2.0 之外, 该点很可能就是表达差异基因.

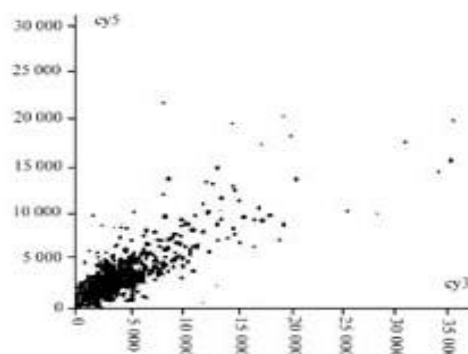


图 1 例 1 病理组织与正常组织散点图.

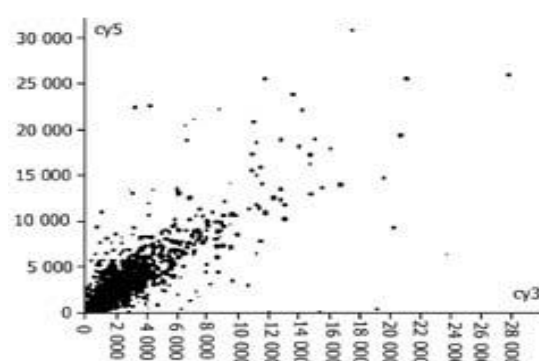


图 2 例 2 号病理组织与正常组织散点图.

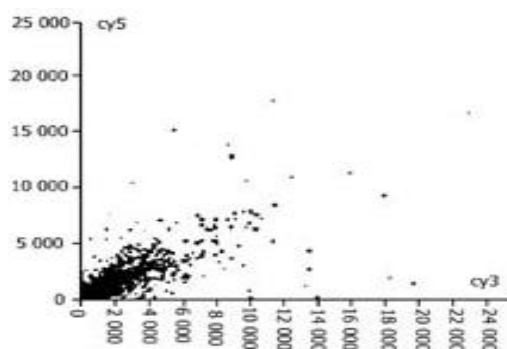


图 3 例 3 病理组织与正常组织散点图.

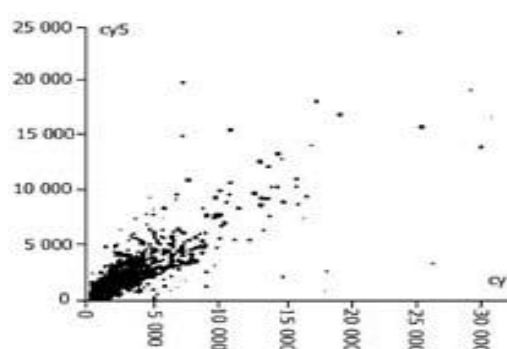


图 4 例 4 病理组织与正常组织散点图.

图 5-8 为表达谱芯片双色荧光扫描图像, 分别代表了癌变组织中和正常组织中基因的表达. 对于某一点的两种叠加荧光信号, 如果 Cy3 信号较强, 该点显绿色(下调趋势), 如果 Cy5 信号较强, 该点显红色(上调趋势); 如果强度相似, 即呈黄色.

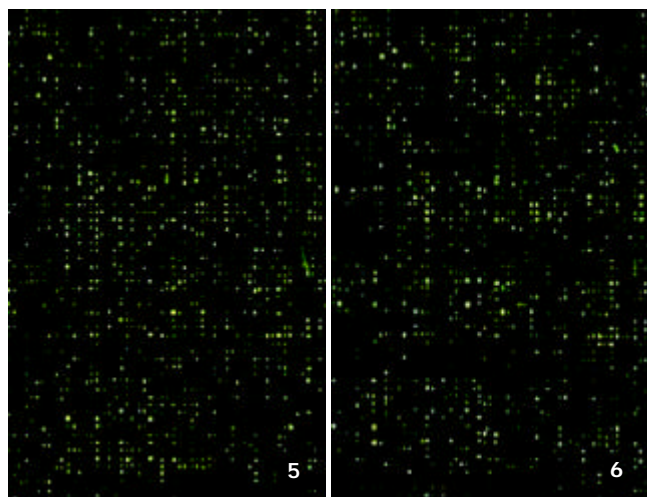


图5 例1 基因芯片双色重叠扫描图. 图6 例2 基因芯片双色重叠扫描图.

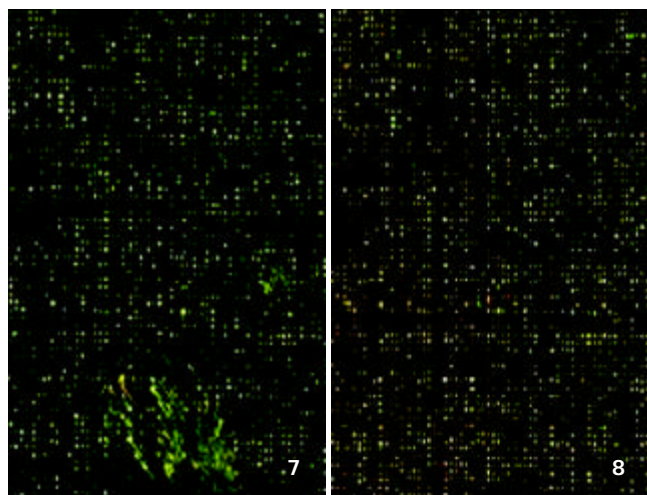


图7 例3 基因芯片双色重叠扫描图. 图8 例4 基因芯片双色重叠扫描图.

**2.2 胃癌组织的基因表达差异** 所选4例原发胃癌标本, 以胎胃为正常对照, 筛选与胃癌组织中表达改变有差异的基因. 在进入研究的4 096条基因中, 发现表达差异相差两倍以上基因有80条(1.95%), 其中表达上调的28条, 下调的52条, 其中包括肿瘤基因及肿瘤相关基因; 为细胞周期蛋白; 蛋白转录合成和转录因子; 细胞受体; 免疫因子; 信号传导和传递蛋白; 代谢相关基因; 蛋白翻译合成基因, 发育基因.

**2.3 两证型基因表达差异** 两证型基因表达, 除上述80条基因与正常胃比较表达有显著性差异外, 两亚型之间比较, 表达有差异的基因有167条, 其中热毒内蕴兼气虚亚型中表达差异有71条, 上调者35条, 下调者36条; 包括了: 4条癌基因或抑癌基因(2升2降); 5条细胞周期蛋白类基因(2升3降); 1条离子通道和输蛋白(降); 5条外压反应蛋白(2升3降); 3条DNA结合转录因子(1升2降); 2条细胞受体(降); 9条免疫相关基因(8升1降); 21条细胞信号的传递蛋白(9升12降); 12条代谢相关基因(11升1降); 10条蛋白翻译合成蛋白(5升5降); 1发育相关基因(降); 10条其他基因. 根据已查的文献, 上调的基因有: 干扰素相关基因、nm-23、CD24、P<sup>18</sup>, 下调基

因的有: 细胞周期素E、IV型胶原酶等. 气虚兼瘀血亚型, 表达有差异的基因有96条, 上调57条, 下调39条, 包括了: 6条癌基因或抑癌基因(3升3降); 8条细胞周期蛋白类基因(5升3降); 3条离子通道和输蛋白(2升1降); 12条外压反应蛋白(3升9降); 2条细胞凋亡相关基因(升); 1条DNA合成修复重组蛋白(升); 6条DNA结合转录因子(5升1降); 3条细胞受体(1升2降); 5条免疫相关基因(4升1降); 14条细胞信号的传递蛋白(4升10降); 17条代谢相关基因(13升4降); 8条蛋白翻译合成蛋白(升); 4发育相关基因(1降3升); 23条其他基因. 据所查文献有CD53、M15796等增高, 下调的有NM-006096等.

### 3 讨论

我们所选病例中, 都有不同程度的气虚和毒邪两因素, 因此在胃癌组织中既有代谢相关基因(X51405)的下降, 免疫相关因子(如人类免疫G蛋白)的下降表明了胃癌的发生与自身免疫力的下降相关, 同时也有肿瘤转录相关基因(M97935)的增高; P<sup>21-Ras</sup> [6-9]在信号传递中起作用, 这种已失调活性的效应分子的长期刺激, 就导致细胞的无限增生而显示癌化现象. 组织中的P<sup>21-ras</sup>突变, 都提示癌基因突变. 这些变化显示了胃癌患者既有脏腑功能下降, 又有癌毒内蕴, 呈发展趋势.

热毒内蕴兼气虚亚型的基因表达特点: nm23基因增高. nm23<sup>[10-17]</sup>是一种与肿瘤转移抑制有关的基因. 其基因编码产物为核苷酸激酶(NDPK), 参与体内三磷酸核苷的生成, 通过影响微管聚合状态及G蛋白介导的信号转导通路而调节细胞代谢, 在肿瘤细胞的增生、分化、侵袭及转移过程起重要作用. 因此检测nm23基因有无异常表达降低对胃癌有无转移及预判断具有重要意义. P<sup>18</sup>基因表达增高. P<sup>18</sup>是一种多肿瘤抑制蛋白基因<sup>[18-21]</sup>. 主要作用CDF4/CDK6两种CDK的蛋白激酶活性, 具有特异性的抑制作用, 而细胞周期素依赖性蛋白激酶CDF处于细胞周期的中心, 有关CDK分子的不同位点的磷酸化修饰决定了CDK蛋白的活性, 并决定了一系列与基因表达有关的蛋白的磷酸化修饰状态, 从而对细胞周期具有调节机制. 因此P<sup>18</sup>蛋白也是细胞周期中的一个重要的有抑制作用的蛋白质. 免疫相关基因增高. 有白介素-受体mRNA、干扰素诱导的9-27mRNA和56-ku蛋白质、人类B细胞促进因子增高. 有实验证明这些细胞因子(白介素、干扰素诱导、人类B细胞促进因子)增高能抑制和杀伤肿瘤细胞生长, 其机制可能还与促进肿瘤抗原表达, 有利于机体某些免疫活性细胞识别、黏附和杀伤有关. 表明本型患者正气未虚, 尚有抗邪个出之势. 细胞周期素E (cyclin E)减少<sup>[22-30]</sup>. 过表达时具有一定的促进细胞进入到S期的作用, 而异源性细胞周期素E (cyclin E)足以诱导分裂后处于G1期的细胞进行另一轮的DNA复制以及分裂过程, 同时异源性表达的细胞周期素E也足以诱导细胞周期素A和B的积累, 而这两种细胞周期素又是有丝分裂期所必须的. 细胞周期



素 E (cyclin E) 促进细胞周期素 A 和 B 积累的机制, 不是促进这两种细胞周期素的转录, 可能是抑制了细胞周期素降解机制, 使这两种细胞周期素的蛋白更为稳定. 下降则使细胞进入 G1 期及 DNA 复制过程受阻. IV 型胶原酶下降. IV 型胶原酶是其底膜结构中最重要组成. 肿瘤细胞要通过其底膜进行转移, 必须分泌这种酶, 以破坏其底膜的结构, 因而推测肿瘤细胞转移与 IV 型胶原酶表达水平与活性有关. 当 IV 型胶原酶下降时, 肿瘤的转移受阻.

通过对表达有显著差异的基因功能的认识, 可以看到, 在热毒内蕴兼气虚证中, 由于正气未衰, 尚有防御功能, 因此抑癌基因和有抑癌作用的基因表达增强 (nm23 基因、P<sup>18</sup> 基因、干扰素相关基因), 具有肿瘤生长和转移作用的基因下降 (细胞周期素 E、IV 型胶原酶). 抗癌因素强于癌毒扩散因素. 在临床上所表现的证型以实为主, 病变较轻.

气虚兼瘀血型的基因谱表达特点: CD53 基因、未成熟瘤克隆转录子、周期蛋白基因、D 型细胞周期蛋白互作蛋白 1 等表达增强. 这些基因在胃癌发生发展过程中的作用机制有待于进一步研究. 但热毒内蕴兼气虚亚型中基因表达特点在本亚型不具备.

总之, 胃癌中医证型形成机制与基因表达有关, 因此阐明基因与证之间的联系, 对认识疾病的发生机制、预测疾病的转归无疑会发挥重要作用. 研究基因表达谱改变与证型多样性之间的联系是一个崭新的领域, 也是研究中医证实质的关键所在, 应引起我们足够的重视.

#### 4 参考文献

- 余伯阳, 严永清. 浅析现代生物研究方法及其与中医药现代化的关系. 世界科学技术 - 中药现代化思路与方法 2001; 3:45-49
- 张昱, 谢雁鸣. 后基因组时代中医药研究思路方法新探. 中医药学刊 2001;19:426-427
- 王忠, 王阶, 王永炎. 后基因组时代中医证候组学研究的思考. 中国中西医结合杂志 2001;21:621-622
- Yasui W, Oue N, Kuraoka K, Nakayama H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001; 4:113-121
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286:531-537
- Go JH, Yang WI. Expressions of p53 and p21 in primary gastric lymphomas. *J Korean Med Sci* 2001;16:731-735
- Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21(WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94:2107-2112
- Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushimi K, Tsushimi M, Sasaki K. Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39:603-610
- Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushimi K, Tsushimi M, Sasaki K. Genomic structure of the human beta-PIX gene and its alteration in gastric cancer. *Cancer Lett* 2002;177:203-208
- Terada R, Yasutake T, Nakamura S, Hisamatsu T, Sawai T, Yamaguchi H, Nakagoe T, Ayabe H, Tagawa Y. Clinical significance of nm23 expression and chromosome 17 numerical aberrations in primary gastric cancer. *Med Oncol* 2002;19:239-248
- Ji SQ, Hua YW, Zhuang J, Gao Y, Kong Y, Han SL, Shao YF. Significance of COX-2, p53, proliferating cell nuclear antigen and nm23 expressions in gastric cancer and its behavior. *Ai Zheng* 2002;21:619-624
- Nesi G, Palli D, Pernice LM, Saieva C, Paglierani M, Kroning KC, Catarzi S, Rubio CA, Amorosi A. Expression of nm23 gene in gastric cancer is associated with a poor 5-year survival. *Anticancer Res* 2001;21:3643-3649
- Wang CS, Lin KH, Hsu YC. Alterations of thyroid hormone receptor alpha gene: frequency and association with Nm23 protein expression and metastasis in gastric cancer. *Cancer Lett* 2002;175:121-127
- Iizuka N, Tangoku A, Hazama S, Yoshino S, Mori N, Oka M. Nm23-H1 gene as a molecular switch between the free-floating and adherent states of gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2001;174:65-71
- Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361
- Hsu NY, Chow KC, Chen WJ, Lin CC, Chou FF, Chen CL. Expression of nm23 in the primary tumor and the metastatic regional lymph nodes of patients with gastric cardiac cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:1752-1757
- Yoo CH, Noh SH, Kim H, Lee HY, Min JS. Prognostic significance of CD44 and nm23 expression in patients with stage II and stage IIIA gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 1999;71:22-28
- Bai F, Pei XH, Godfrey VL, Xiong Y. Haploinsufficiency of p18 (INK4c) sensitizes mice to carcinogen-induced tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23:1269-1277
- Kim DS, Froelick GJ, Palmiter RD. Dopamine-dependent desensitization of dopaminergic signaling in the developing mouse striatum. *J Neurosci* 2002;22:9841-9849
- Lasak JM, Welling DB, Akhmeteva EM, Salloum M, Chang LS. Retinoblastoma-cyclin-dependent kinase pathway deregulation in vestibular schwannomas. *Laryngoscope* 2002;112:1555-1561
- Schon A, Fingerhut C, Hess WR. Conserved and variable domains within divergent mase P RNA gene sequences of *Prochlorococcus* strains. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:1383-1389
- Chetty R, Sitti CW. Cyclin E immunoexpression in gastric cancer does not correlate with clinicopathological parameters. *Histopathology* 2003;42:66-69
- Yao YL, Xu B, Song YG, Zhang WD. Overexpression of cyclin E in Mongolian gerbil with *Helicobacter pylori*-induced gastric precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:60-63
- Ferreri AJ, Ponzoni M, Pruneri G, Freschi M, Rossi R, Dell'Oro S, Baldini L, Buffa R, Carboni N, Villa E, Viale G. Immunoreactivity for p27(KIP1) and cyclin E is an independent predictor of survival in primary gastric non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2001;94:599-604
- Moragoda L, Jaszewski R, Majumdar AP. Curcumin induced modulation of cell cycle and apoptosis in gastric and colon cancer cells. *Anticancer Res* 2001;21:873-878
- Lin L, Prescott MS, Zhu Z, Singh P, Chun SY, Kuick RD, Hanash SM, Orringer MB, Glover TW, Beer DG. Identification and characterization of a 19q12 amplicon in esophageal adenocarcinomas reveals cyclin E as the best candidate gene for this amplicon. *Cancer Res* 2000;60:7021-7027
- So JB, Samarasinghe K, Raju GC, Moolchhala SM, Ti TK. Expression of cell-cycle regulators p27 and cyclin E correlates with survival in gastric carcinoma patients. *J Surg Res* 2000; 94:56-60
- Hernandez-Torres J, Yunta M, Lazo PA. Differential cooperation between regulatory sequences required for human CD53 gene expression. *J Biol Chem* 2001;276:35405-35413
- Ferrer M, Yunta M, Lazo PA. Pattern of expression of tetraspanin antigen genes in Burkitt lymphoma cell lines. *Clin Exp Immunol* 1998;113:346-352
- Mollinedo F, Fontan G, Barasoain I, Lazo PA. Recurrent infectious diseases in human CD53 deficiency. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:229-231

# MUC1 基因免疫抑制 H22 肝癌生长的实验研究

袁时芳, 王 岭, 李开宗, 颜 真, 韩 苇, 张英起

袁时芳, 王岭, 中国人民解放军第四军医大学西京医院血管内分泌外科  
陕西省西安市 710033

李开宗, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西  
安市 710033

颜真, 韩苇, 张英起, 中国人民解放军第四军医大学科研部生物技术中  
心 陕西省西安市 710033

袁时芳, 男, 1964-08-01 生, 安徽省马鞍山市人, 汉族. 1987 年第四军医  
大学本科毕业, 主治医师, 讲师, 博士. 主要从事血管内分泌外科和肿瘤基因  
疫苗的研究.

国家自然科学基金资助, No. 39470683

项目负责人: 袁时芳, 710033, 陕西省西安市长乐西路 17 号, 中国人民解放军  
第四军医大学西京医院血管内分泌外科. shifangy@fmmu.edu.cn

电话: 029-3375271

收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

## Inhibitory effect of MUC1 gene immunization on H22 hepatocellular carcinoma growth

Shi-Fang Yuan, Ling Wang, Kai-Zong Li, Zhen Yan, Wei Han,  
Ying-Qi Zhang

Shi-Fang Yuan, Ling Wang, Department of Vascular and Endocrine Surgery,  
Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033,  
Shaanxi Province, China

Kai-Zong Li, Department of Hepato-biliary Surgery, Xijing Hospital,  
Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China  
Zhen Yan, Wei Han, Ying-Qi Zhang, Biotechnology Center, Fourth  
Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.  
39470683

Correspondence to: Shi-Fang Yuan, Department of Vascular and Endo-  
crine Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an  
710033, Shaanxi Province, China. shifangy@fmmu.edu.cn

Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

AIM: To investigate the special anti-H22 hepatocellular carcinoma growth effect of the MUC1 gene immunization.

METHODS: Balb/c mice were immunized intramuscularly with 100  $\mu$ g MUC1 cDNA 3 times at 3-weekly intervals. Three weeks after the last immunization, tumor challenge experiments were performed by using MUC1 expressing tumor cell line H22. Tumor growth inhibition and body protection were observed two weeks later. After 43d of challenge experiments, all mice were killed and tumors were weighed. Histological analysis of tumor tissue was carried out with HE staining.

RESULTS: After 43 d of challenge experiments, the volumes of H22 hepatocellular carcinoma in MUC1cDNA, pcDNA3.1 (+) and NS groups were  $547 \pm 59$  mm<sup>3</sup>,  $1185 \pm 84$  mm<sup>3</sup> and  $1220 \pm 95$  mm<sup>3</sup> ( $P < 0.01$ ), respectively. The average mass of H22 hepatocellular carcinoma in the three groups was  $1.87 \pm 0.96$  g,  $4.19 \pm 1.34$  g and  $4.23 \pm 1.32$  g ( $P < 0.01$ ), respectively. Tumorigenic rate was only 50 % in MUC1cDNA group, and was 100 % in pcDNA3.1(+) and NS group. H22

hepatocellular carcinoma growth in mice of MUC1cDNA group was significantly suppressed ( $P < 0.01$ ), and a significant body protective effect was found in mice of MUC1cDNA group ( $P < 0.05$ ), compared with control group. Histological analysis showed that the H22 hepatocellular carcinoma tissues were markedly necrosed in mice of MUC1cDNA group compared with that in control group.

CONCLUSION: MUC1 gene immunization can significantly suppress H22 hepatocellular carcinoma growth.

Yuan SF, Wang L, Li KZ, Yan Z, Han W, Zhang YQ. Inhibitory effect of MUC1 gene immunization on H22 hepatocellular carcinoma growth. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1322-1325

## 摘要

目的: 观察 MUC1 基因免疫对 H22 肝癌生长的特异性抑制作用.

方法: 采用股四头肌肌肉注射法将构建的 MUC1 基因疫苗 pcDNA3.1-MUC1 免疫 Balb/c 小鼠, 每次 100  $\mu$ g, 3 wk/次, 共 3 次. 最后一次基因免疫后 3 wk, 接种表达 MUC1 的 H22 肝癌细胞. 2 wk 后观察、记录肿瘤的生长情况. 于肿瘤细胞接种后 43 d, 处死全部动物, 称肿瘤的质量. 荷瘤小鼠的瘤组织常规 HE 染色.

结果: 肿瘤细胞接种后 43 d, MUC1 预防组, 质粒 pcDNA3.1 对照组及生理盐水阴性对照组 H22 肝癌大小分别为  $547 \pm 59$  mm<sup>3</sup>,  $1185 \pm 84$  mm<sup>3</sup> 和  $1220 \pm 95$  mm<sup>3</sup> ( $P < 0.01$ ); 平均瘤质量分别为  $1.87 \pm 0.96$  g,  $4.19 \pm 1.34$  g 和  $4.23 \pm 1.32$  g ( $P < 0.01$ ); pcDNA3.1 对照组和生理盐水阴性对照组 100 % 可见瘤体形成, 肿瘤生长, 而 MUC1 基因疫苗预防组仅见 50 % (5/10) 的小鼠有瘤体形成, 与对照组相比, MUC1 预防组 H22 肝癌生长受到明显抑制 ( $P < 0.01$ ); MUC1 预防组小鼠免疫保护有显著差异 ( $P < 0.05$ ). 病理学检查结果显示, 与 pcDNA3.1 对照组相比, MUC1 DNA 疫苗预防组鼠 H22 肝癌组织大量坏死.

结论: MUC1 基因免疫显著抑制 H22 肝癌生长.

袁时芳, 王岭, 李开宗, 颜真, 韩苇, 张英起. MUC1 基因免疫抑制 H22 肝癌生长的实验研究. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1322-1325

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1322.asp>

## 0 引言

尽管化疗等有效的抗肿瘤治疗使癌症患者生存率不断提高<sup>[1-4]</sup>, 然而, 大多数癌症转移患者因不能被治

愈而死亡<sup>[5-7]</sup>. 因此, 探索有效的治疗肿瘤的新途径十分必要<sup>[8-10]</sup>. DNA疫苗以其简单而独特的免疫方式和良好的动物免疫效果而倍受关注<sup>[11, 12]</sup>. 人 MUC1 基因的编码产物 Mucin 是一种 I 型跨膜蛋白. 研究发现, MUC1 在乳腺癌及肝癌等多种肿瘤中异常表达且由于糖基化不全, 导致新的抗原肽表位暴露, 是肿瘤主动特异性免疫治疗理想的靶分子<sup>[13-17]</sup>. 我们探讨 MUC1 基因疫苗是否可以特异性抑制 H22 肝癌生长.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

小鼠肝癌细胞 H22 为本室保存. Balb/c 小鼠 20 只, 雌雄不限, 4-6 wk, 15-20 g, 第四军医大学实验动物中心提供. 含 32 tandem repeats 的 MUC1 质粒 pVax-MUC1 由英国 Imperial Cancer Research Fund 的 Taylor-Papadimitriou 教授惠赠, E.coli DH5  $\alpha$  由本室保存. E.Z.N.A<sup>R</sup> plasmid Miniprep Kit, 购自 Omega 公司; DMEM 购自 Gibco 公司; RPMI1640 培养液(Sigma 公司); 小牛血清购自杭州四季清生物工程材料研究所; MUC1 单克隆抗体为 Antibody Diagnostica 公司产品; 链霉素-卵白素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司).

### 1.2 方法

MUC1 基因疫苗 pcDNA3.1(+)-MUC1 构建及表达见文献[18]. 碱裂解法大量制备重组质粒 pcDNA3.1-MUC1 及空载体 pcDNA3.1, 采用聚乙二醇沉淀法(PEG 法)纯化. 无菌生理盐水溶解质粒, 紫外分光光度计测  $A_{260}$  及  $A_{280}$  计算浓度,  $A_{260}/A_{280}$  值达 1.8-2.0, 定量, 用无菌生理盐水稀释成浓度为 1 g/L, -20 °C 保存. 免疫组织化学法检测 H22 肝癌细胞 MUC1 表达 取少许 H22 肝癌细胞, 浓度以形成单细胞层为宜, 分别滴于多聚赖氨酸处理过的载玻片上, 经空气干燥后, -20 °C 冷丙酮固定 5 min, 接着在蒸馏水中洗一下, 空气中干燥, 4 °C 保存. ABC 法免疫染色, 封片待检. Balb/c 小鼠 20 只随机分为 3 组, pcDNA3.1-MUC1 实验组(MUC1 组)10 只, pcDNA3.1 空白对照组(pcD3.1 组)5 只, 灭菌生理盐水阴性对照组(NS 组)5 只. 每只小鼠 100  $\mu$ L (1 g/L) 质粒, 小鼠股四头肌肌肉丰厚处肌肉注射. 3 wk / 次, 共 3 次, 最后一次基因免疫后 3 wk, 实验组和对照组小鼠于右臀及大腿部皮下接种 0.2 mL ( $10^{10}$ /L) H22 肝癌细胞, 进行保护实验. 每周观察记录 1 次肿瘤的生长情况, 用游标卡尺测量肿瘤的长、短径. 肿瘤体积按公式  $V(\text{mm}^3)=0.4ab^2$  计算<sup>[19]</sup>,  $a$  = 长(mm),  $b$  = 宽(mm), 比较肿瘤大小并绘制生长曲线. 于肿瘤细胞接种后 43 d, 处死全部存活动物, 称肿瘤的质量. 解剖并分离荷瘤 Balb/c 小鼠的瘤组织, 用 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色镜检, 观察肿瘤的组织细胞结构.

统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行方差分析和  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

### 2.1 肿瘤生长

接种 H22 肝癌细胞后 43 d, MUC1 预防组、质粒 pcDNA3.1 对照组及生理盐水阴性对照组 H22 肝癌大小分别为  $547 \pm 59 \text{ mm}^3$ ,  $1185 \pm 84 \text{ mm}^3$  和  $1220 \pm 95 \text{ mm}^3$ , 3 组肿瘤生长速度有非常显著的差异( $F=198.29$ ,  $P=0.0001$ , 图 1), 差别主要在 MUC1 预防组与 pcDNA3.1 对照组和 MUC1 预防组与 NS 对照组之间( $P<0.01$ ), MUC1 预防组 H22 肝癌生长受到明显抑制. MUC1 DNA 免疫对小鼠 H22 肝癌的瘤体质量为  $1.87 \pm 0.96 \text{ g}$ , 比 pcD3.1 组  $4.19 \pm 1.34 \text{ g}$  和 NS 组  $4.23 \pm 1.32 \text{ g}$  轻( $P<0.01$ ).

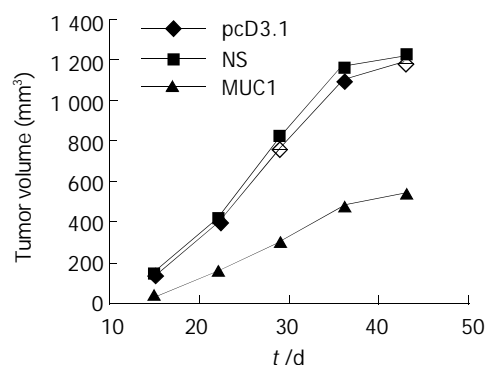


图1 小鼠 H22 肝癌生长曲线.

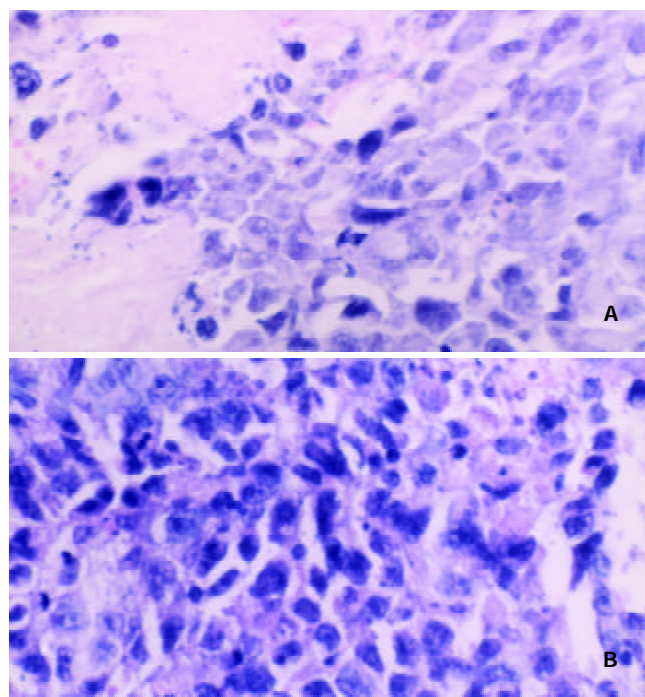


图2 MUC1 疫苗组 H22 肝癌组织细胞坏死.  
A: MUC1 cDNA 组; B: 对照组.

### 2.2 体内免疫保护

小鼠接种 H22 肝癌细胞后观察 43 d, MUC1 基因疫苗预防组仅见 50%(5/10)的小鼠有瘤体形成, 而 pcDNA3.1 对照组及生理盐水阴性对照组 100% 可见瘤体形成, 肿瘤生长. 与对照组相比, MUC1 预防组小鼠免疫保护有显著差异(校正  $\chi^2=4.27$ ,  $P<0.05$ ). 与对照组相比, MUC1 DNA 疫苗预防组鼠 H22 肝癌组织中大量肿瘤细胞变性和坏死(图2). H22 肝癌细胞滴片



## 免疫组化呈阳性(图3)

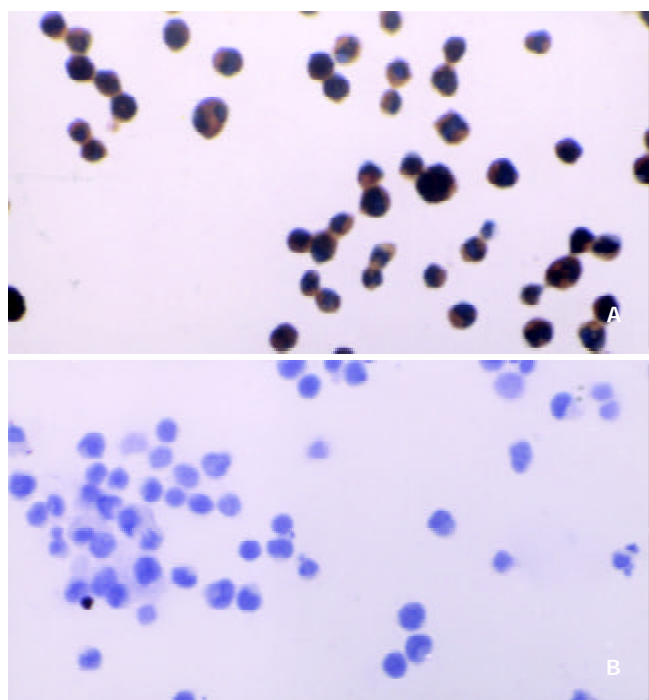


图3 H22肝癌细胞 MUC1 免疫组化染色。  
A: Positive; B: Negative.

## 3 讨论

基因免疫也称基因疫苗或DNA疫苗,是将编码某种抗原的基因片段克隆到真核表达质粒,再用该质粒DNA免疫动物,使之在机体细胞内持续表达具有天然构象的抗原蛋白,并刺激机体产生抗原特异的体液免疫和细胞免疫应答。他的突出优点是能通过不同途径诱导产生细胞毒T淋巴细胞(CTL),因此基因免疫在诱导抗肿瘤免疫方面比常规疫苗更具有优势。肿瘤基因疫苗是将肿瘤相关抗原(TAA)或肿瘤特异抗原作为抗肿瘤免疫攻击的靶点<sup>[20]</sup>。人MUC1基因的编码产物Mucin,他的多肽骨架由胞外段、跨膜段和胞内段3部分组成,含有抗原表位的重复序列位于胞外段,是细胞表面最先与机体免疫系统接触的膜表面分子,可诱发特异性抗乳腺癌的CTL免疫应答<sup>[21-26]</sup>。Takao et al<sup>[16]</sup>报道,MUC1在肝内胆管癌65%高表达,且与癌灶肝转移及预后不良相关。Cao et al<sup>[17]</sup>研究发现,人肝细胞癌(HCC)MUC1阳性反应,可作为HCC的预后指标。MUC1基因免疫是否可以抑制肝癌生长尚不清楚。我们用构建的编码Mucin蛋白的基因疫苗pcDNA3.1-MUC1质粒免疫Balb/c小鼠后,用表达MUC1的H22肝癌细胞接种,证实MUC1基因免疫可以在小鼠体内特异性抑制H22肝癌生长。

动物实验前,我们用免疫组织化学法检测MUC1在H22肝癌细胞表达。结果表明,H22肝癌细胞滴片免疫组化均呈阳性染色结果。在其基础上,我们将 $2 \times 10^6$ 个H22肝癌细胞接种在Balb/c小鼠右臀及大腿部皮下,接种肿瘤细胞后10d左右即可摸到皮下的瘤结节,肿瘤在不同个体的生长速度均匀,成瘤率100%。

稳定的H22肝癌荷瘤动物模型的建立,为下一步的免疫预防研究提供了条件。

基因免疫结果显示,接种H22肝癌细胞后43d,MUC1预防组、质粒pcDNA3.1对照组及生理盐水阴性对照组H22肝癌大小分别为 $547 \pm 59 \text{ mm}^3$ ,  $1185 \pm 84 \text{ mm}^3$ ,  $1220 \pm 95 \text{ mm}^3$ ,与对照组相比,MUC1预防组肿瘤生长速度显著降低( $P < 0.01$ )。pcDNA3.1(pcD3.1)组和生理盐水(NS)对照组的肿瘤生长速度未见显著性差异( $P > 0.05$ )。小鼠接种H22肝癌细胞后观察43d,MUC1基因疫苗预防组仅见50%(5/10)的小鼠有瘤体形成,而pcDNA3.1对照组及生理盐水阴性对照组100%可见瘤体形成,肿瘤生长。与对照组相比,MUC1预防组小鼠免疫保护有显著差异( $P < 0.05$ )。生长曲线、平均瘤重和病理学检查结果均表明,与对照组相比,MUC1预防组H22肝癌生长受到明显抑制( $P < 0.01$ )。

总之,初步研究表明MUC1基因疫苗免疫接种,可显著抑制H22肝癌生长,对于Balb/c小鼠荷瘤有免疫保护作用。肝癌在我国及亚洲国家常见<sup>[27-35]</sup>,因此,本研究具有广阔前景。

## 4 参考文献

- 1 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma—cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 2 Shimoda M, Bando T, Nagata T, Shirosaki I, Sakamoto T, Tsukada K. Prophylactic chemolipiodolization for postoperative hepatoma patients. *Hepatogastroenterology* 2001;48:493-497
- 3 Huang YH, Wu JC, Lui WY, Chau GY, Tsay SH, Chiang JH, King KL, Huo TI, Chang FY, Lee SD. Prospective case-controlled trial of adjuvant chemotherapy after resection of hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 2000;24:551-555
- 4 Pacella CM, Bizzarri G, Cecconi P, Caspani B, Magnolfi F, Bianchini A, Anelli V, Pacella S, Rossi Z. Hepatocellular carcinoma: long-term results of combined treatment with laser thermal ablation and transcatheter arterial chemoembolization. *Radiology* 2001;219:669-678
- 5 Itamoto T, Katayama K, Fukuda S, Fukuda T, Yano M, Nakahara H, Okamoto Y, Sugino K, Marubayashi S, Asahara T. Percutaneous microwave coagulation therapy for primary or recurrent hepatocellular carcinoma: long-term results. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1401-1405
- 6 Zheng N, Ye SL, Sun RX, Zhao Y, Tang ZY. Effects of cryopreservation and phenylacetate on biological characters of adherent LAK cells from patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:233-236
- 7 Wakabayashi H, Ishimura K, Okano K, Izuishi K, Karasawa Y, Goda F, Maeba T, Maeta H. Is preoperative portal vein embolization effective in improving prognosis after major hepatic resection in patients with advanced-stage hepatocellular carcinoma? *Cancer* 2001;92:2384-2390
- 8 Huang JZ, Xia SS, Ye QF, Jiang HY, Chen ZH. Effects of p16 gene on biological behaviour in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:84-88
- 9 Sun L, Zhou YX, Hao CQ, Feng ZH, Zhao J, Hu PZ, Fu Y, Ma FC, Chang JQ, Wang JP, Nie QH. Effect of DNA vaccine on anti-HCV infection in mice with subcutaneous inoculating tumor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:165-168
- 10 Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki Y, Suzuki F, Tsubota A, Chayama K, Murashima N, Kumada H. Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma



- after complete resection or ablation of the primary tumor -A prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 2000;32:228-232
- 11 Bronte V. Genetic vaccination for the active immunotherapy of cancer. *Curr Gene Ther* 2001;1:53-100
- 12 Bhattachary R, Bukkapatnam R, Prawoko I, Soto J, Morgan M, Salup RR. Efficacy of vaccination with plasmid DNA encoding for HER2/neu or HER2/neu-eGFP fusion protein against prostate cancer in rats. *Int Immunopharmacol* 2002;2:783-796
- 13 Mukherjee P, Madsen CS, Ginardi AR, Tinder TL, Jacobs F, Parker J, Agrawal B, Longenecker BM, Gendler SJ. Mucin 1-specific immunotherapy in a mouse model of spontaneous breast cancer. *J Immunother* 2003;26:47-62
- 14 Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer* 2001;91:1973-1982
- 15 von Mensdorff-Pouilly S, Snijdwint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers* 2000;15:343-356
- 16 Takao S, Uchikura K, Yonezawa S, Shinchi H, Aikou T. Mucin core protein expression in extrahepatic bile duct carcinoma is associated with metastases to the liver and poor prognosis. *Cancer* 1999;86:1966-1975
- 17 Cao Y, Karsten U, Otto G, Bannasch P. Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich antigen, Tn, sialosyl-Tn, and alpha2, 6-linked sialic acid in hepatocellular carcinomas and preneoplastic hepatocellular lesions. *Virchows Arch* 1999;434: 503-509
- 18 Yuan SF, Li KZ, Han W, Yan ZH, Zhang YQ. Construction of eukaryotic expression vectors containing coding of human full length MUC-1 gene and its expression in COS-7. *Di Si Junyi Daxue Xuebao* 2002;23:1231-1234
- 19 Carr-Brendel V, Markovic D, Ferrer K, Smith M, Taylor-Papadimitriou J, Cohen EP. Immunity to murine breast cancer cells modified to express MUC-1, a human breast cancer antigen, in transgenic mice tolerant to human MUC-1. *Cancer Res* 2000;60:2435-2443
- 20 Mahvi DM, Shi FS, Yang NS, Weber S, Hank J, Albertini M, Schiller J, Schalch H, Larson M, Pharo L, Gan J, Heisey D, Warner T, Sondel PM. Immunization by particle-mediated transfer of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into autologous tumor cells in melanoma or sarcoma patients: report of a phase I/IB study. *Hum Gene Ther* 2002;13:1711-1721
- 21 Yuan SF, Li KZ, Yan ZH, Han W, Zhang YQ. Suppressing effect of MUC1 gene vaccine on EMT6 breast cancer growth. *Di Si Junyi Daxue Xuebao* 2002;24:327-330
- 22 Snijdwint FG, von Mensdorff-Pouilly S, Karuntu-Wanamarta AH, Verstraeten AA, Livingston PO, Hilgers J, Kenemans P. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients. *Int J Cancer* 2001;93:97-106
- 23 Johnen H, Kulbe H, Pecher G. Long-term tumor growth suppression in mice immunized with naked DNA of the human tumor antigen mucin (MUC1). *Cancer Immunol Immunother* 2001;50:356-360
- 24 Musselli C, Ragupathi G, Gilewski T, Panageas KS, Spinat Y, Livingston PO. Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1. *Int J Cancer* 2002;97:660-667
- 25 Miles DW, Taylor-Papadimitriou J. Therapeutic aspects of polymorphic epithelial mucin in adenocarcinoma. *Pharmacol Ther* 1999;82:97-106
- 26 Soares MM, Mehta V, Finn OJ. Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection. *J Immunol* 2001;166:6555-6563
- 27 Yuen MF, Cheng CC, Lauder IJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL. Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience. *Hepatology* 2000;31:330-335
- 28 Chen TH, Chen CJ, Yen MF, Lu SN, Sun CA, Huang GT, Yang PM, Lee HS, Duffy SW. Ultrasound screening and risk factors for death from hepatocellular carcinoma in a high risk group in Taiwan. *Int J Cancer* 2002;98:257-261
- 29 Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, Zhou J, Qiu SJ, Ma ZC, Zhou XD, Ye SL. Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 2001;7:28-32
- 30 Yang YL, Dou KF, Li KZ. Correlation of UPAR and VEGF expression with invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:381-383
- 31 Li XM, Tang ZY, Qin LX, Zhou J, Sun HC. Serum vascular endothelial growth factor is a predictor of invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:511-517
- 32 Niu Q, Tang ZY, Ma ZC, Qin LX, Zhang LH. Serum vascular endothelial growth factor is a potential biomarker of metastatic recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:565-568
- 33 Zhou J, Tang ZY, Fan J, Wu ZQ, Li XM, Liu YK, Liu F, Sun HC, Ye SL. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:57-61
- 34 Sun HC, Tang ZY, Li XM, Zhou YN, Sun BR, Ma ZC. Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:419-426
- 35 Shuto T, Hirohashi K, Kubo S, Tanaka H, Yamamoto T, Higaki I, Takemura S, Kinoshita H. Treatment of adrenal metastases after hepatic resection of a hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 2001;18:294-297

# 纺锤体组装关卡基因 hsMAD2 在人肝细胞肝癌中的表达及其意义

李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟

李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟, 中国人民解放军第四军医大学西京医院病理科 陕西省西安市 710033  
李擒龙, 男, 1975-10-24 生, 四川省蓬安县人, 汉族. 1998 年第三军医大学本科毕业, 医学硕士, 主要从事肝癌分子病理的研究.  
国家自然科学基金资助课题, No. 39900175  
项目负责人: 王文亮, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院病理科. wlwang@fmmu.edu.cn  
电话: 029-3374541  
收稿日期: 2003-01-03 接受日期: 2003-03-10

## Expression of hsMAD2 in Human Hepatocellular carcinoma and its significance

Qin-Long Li, Wen-Liang Wang, Xiao-Hui Zhang, Wei Yan

Qin-Long Li, Wen-Liang Wang, Xiao-Hui Zhang, Wei Yan, Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39900175  
Correspondence to: Wen-Liang Wang, Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. wlwang@fmmu.edu.cn  
Received: 2003-01-03 Accepted: 2003-03-10

## Abstract

AIM: To study the expression of hsMAD2 in primary human hepatocellular carcinoma(HCC) tissues and its significance.

METHODS: The expression of hsMAD2 was detected with immunohistochemical SABC method in 39 cases of HCC tissue and 26 cases of liver cirrhosis tissue and 3 cases of HCC cell lines, and the relationship between HCC pathological grade and hsMAD2 expression rate was analyzed.

RESULTS: Fifty nine percent (23/39) of HCC tissues expressed hsMAD2, the positive rate was 100 % (15/15) in non-tumor liver cells adjacent to HCC and 92 % (24/26) in cirrhosis tissues. No expression was found in 3 cases of HCC cell lines. There was no significant difference between pathological grade and expression rate of hsMAD2. However, there was a significant difference of expression of hsMAD2 between HCC tissues and cancerous tissues surrounding liver tissues ( $\chi^2=6.888$ ,  $P<0.01$ ) and liver cirrhosis tissues ( $\chi^2=8.656$ ,  $P<0.01$ ).

CONCLUSION: Expression rate of hsmad2 in HCC decreases significantly compared to surrounding liver tissues and liver cirrhosis tissues. hsMAD2 is possibly related to early pathogenesis of HCC.

Li QL, Wang WL, Zhang XH, Yan W. Expression of hsMAD2 in Human Hepatocellular carcinoma and its significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1326-1328

## 摘要

目的: 探讨人原发性肝细胞肝癌中纺锤体组装关卡hsMAD2蛋白的表达及其意义.

方法: 采用免疫组织化学SABC法检测了hsMAD2在39例HCC组织、26例肝硬化组织和3例HCC细胞系的表达情况, 并分析了其阳性率与HCC病理分级的关系.

结果: 59 % (23/39)的HCC组织表达hsMAD2, 而癌旁肝组织的阳性率为100 % (15/15); 肝硬化为92 % (24/26), 3例HCC细胞系均未见表达.hsmad2在HCC中表达率与HCC病理分级无关, 而在癌组织与癌旁肝组织( $\chi^2=6.888$ ,  $P<0.01$ )、肝硬化组织( $\chi^2=8.656$ ,  $P<0.01$ )之间的差异具有显著性.

结论: hsMAD2在HCC组织中的表达率相对于癌旁肝组织和肝硬化组织显著降低, 提示该蛋白的表达可能与早期HCC发生相关.

李擒龙, 王文亮, 张晓晖, 晏伟. 纺锤体组装关卡基因hsMAD2在人肝细胞肝癌中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1326-1328

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1326.asp>

## 0 引言

原发性肝细胞肝癌(primary human hepatocellular carcinoma, HCC)是消化系统常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-8]</sup>, 已经成为严重危害人类生命的主要疾病, 其发病率在我国肝病患者中有明显增加趋势, 其诊断和防治亟待解决<sup>[9-12]</sup>. 但有关HCC的发病机制仍未完全清楚.hsmad2(human, mitotic arrest deficient-2, hsMAD2)是监控有丝分裂时纺锤体行为的最重要的关卡(checkpoint)基因之一. 这类基因可能控制着最初的癌变过程, 因为MAD基因控制着的关卡(纺锤体组装关卡)的失效会导致染色体畸变和基因组的不稳定. 有关人HCC的hsMAD2表达, 及其与HCC病理分级之间的关系, 目前尚未见报道. 我们采用免疫组化技术结合组织病理学观察, 检测了hsMAD2在HCC、癌旁、肝硬化组织和HCC细胞系的表达与分布情况, 分析其阳性率与HCC病理分级的关系, 并探讨hsMAD2在HCC发生和发展中可能的作用及意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HCC39 例、肝硬化组织标本 26 例, 为第四军医大学西京医院病理科经病理诊断证实. HCC 参照 WHO 病理分级标准划分等级, 包括 I 级(HCC I, 肿瘤细胞分化程度高)13 例, II 级(HCC II, 肿瘤细胞分化程度中等)16 例和 III 级(HCC III, 肿瘤细胞分化程度低)10 例. 在 39 例 HCC 中, 15 例伴有癌旁肝组织. 所有标本均经中性甲醛固定, 石蜡包埋, 5  $\mu\text{m}$  厚连续切片. 3 例 HCC 细胞系 HepG2、SMMC-7721 和 HCC, 均为本室保存. 羊抗人 hsMAD2 (C-19) 多克隆抗体为美国 SantaCruz 公司产品. 生物素标记的兔抗山羊 IgG 为北京中山公司产品. 免疫组化 SABC 试剂盒武汉博士德公司产品. DAB 为华美公司产品.

**1.2 方法** 将细胞培养在含 100 mL/L 胎牛血清的 PRMI 1640 培养液中, 在各组细胞培养皿中分别加入已消毒的玻璃盖玻片, 分别接种转染后的细胞约  $1 \times 10^5$  个. 待细胞进入对数生长期后, 取出盖玻片, 用 pH7.4 的 PBS 洗涤 3 次, 再用 950 mL/L 酒精固定 1 h. 自然晾干后,  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存备用. 免疫细胞与组织化学染色, 按照博士德公司 SABC 试剂盒操作步骤进行, 每次染色时均用 PBS 代替 hsMAD2 作为阴性对照. 以多次重复实验证明为 hsMAD2 阳性的 1 例乳腺癌为阳性对照. 同时用抗生物素(avidin)排除了内源性生物素的干扰. 数据处理采用网咯测试法<sup>[13]</sup>, 每例选择 10 个 40 倍视野, 向同一方向移动切片, 不重复, 不重叠, 按照 hsMAD2 阳性细胞数占视野中总细胞数的百分比分为阴性、阳性. 无阳性着色或阳性细胞率小于 5 % 者为阴性(-); 阳性细胞率在大于 5 % 为阳性(+). 采取 2 人双盲法阅片, 观察结果应一致.

**统计学处理** 对数据采用 SPSS 软件进行样本率的  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

hsMAD2 阳性的细胞主要为细胞质着色, 呈棕黄色、细颗粒状, 少部分细胞有细胞核和细胞质同时着色; hsMAD2 在 HCC 中的阳性表达以弥漫性弱阳性为主, 偶见局灶性强阳性表达; 癌旁肝组织特别是癌旁肝硬化组织的表达普遍为较强阳性, 部分肝硬化组织中胆管上皮也可见阳性着色(图1-3); 所有阴性对照均无阳性着色. hsMAD2 在 HCC 中表达的阳性率为 59 % (23/39), 其中 HCC I 62 % (8/13)、HCC II 56 % (9/16)、HCC III 60 % (6/10); 癌旁肝组织的阳性率为 100 % (15/15); 肝硬化为 92 % (24/26). 3 例 HCC 细胞系(HepG2, SMMC-7721 和 HHCC) 均为阴性表达.

经  $\chi^2$  检验, HCC 中 hsMAD2 表达率与癌旁肝组织比较 ( $\chi^2=6.888$ ,  $P<0.01$ )、与肝硬化组织比较 ( $\chi^2=8.656$ ,  $P<0.01$ ) 差异均具有显著性, 但在 HCC 各病理分级之间无显著性差异.

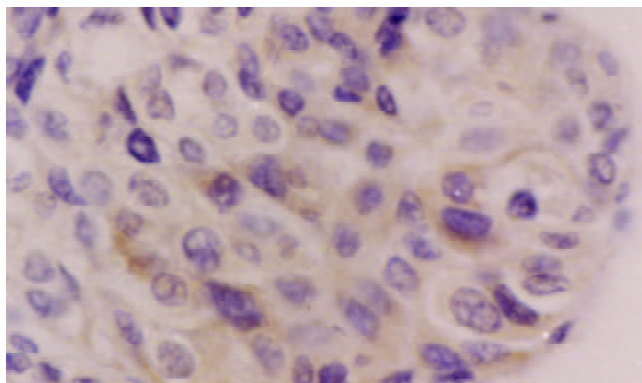


图1 HCC 组织中, hsMAD2 阳性物质表达于细胞质内(SABC  $\times 400$ ).

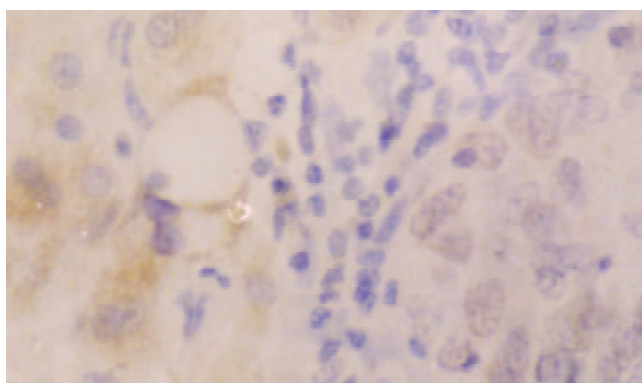


图2 HCC 及癌旁组织中, hsMAD2 阳性物质位于表达于细胞质内及胞膜上(SABC  $\times 400$ ).

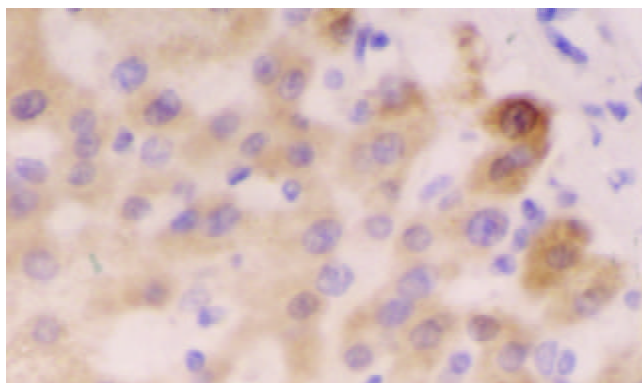


图3 肝硬化组织中, hsMAD2 阳性物质表达于细胞质内, 部分见于核内(SABC  $\times 400$ ).

## 3 讨论

HCC 常见, 位居我国恶性肿瘤发病的第 3 位, 约占全世界 HCC 病例的 42.5 %, 每年死于 HCC 的人数约为 11 万<sup>[14]</sup>. HCC 复发率高, 预后较差<sup>[15-20]</sup>. 有关 HCC 的发病机制, 目前仍不完全清楚.

目前认为以 MAD2 基因为代表的这类基因可能控制着最初的癌变过程, 因为 MAD 基因控制着的关卡的失效会导致染色体畸变和基因组的不稳定(Science 1996; 274(5285):246-248). hsMAD2 在结肠癌、肺癌、胃癌<sup>[21]</sup>、乳腺癌<sup>[22]</sup>和膀胱癌<sup>[23]</sup>的突变率都很低, 但在乳腺癌<sup>[22]</sup>、卵巢癌<sup>[24]</sup>细胞系和肺癌、鼻咽癌<sup>[25]</sup>的蛋白表达降低, 而且, 我们此前在急性白血病中以半定量 RT-PCR 的

方法研究也发现 hsMAD2 的表达较正常明显降低<sup>[26]</sup>。我们应用免疫细胞与组织化学检测技术, 初步检测了 hsMAD2 在 HCC、癌旁肝组织和肝硬化中的表达与分布情况, 结果表明: hsMAD2 在 HCC 组织的检出率(59 %)明显低于肝硬化(92 %)和癌旁肝组织(100 %), 存在着显著的统计学差别( $P < 0.01$ ); 而且, hsMAD2 在 HCC 中的阳性表达以弥漫性弱阳性为主, 偶见局灶性强阳性表达, 而在癌旁肝组织特别是癌旁的肝硬化组织的表达普遍为较强阳性; 在检测的 3 例 HCC 细胞系中, 更是全部为阴性表达。因此可以推测, hsMAD2 表达的降低或缺失可能与 HCC 的发生演进之间存在某种联系。另外, 在 HCC 各病理分级之间无显著性差异, 说明 hsMAD2 的表达降低或缺失可能主要在 HCC 的早期发生中具有某些作用。hsMAD2 能与 CDC20 (cell division cycle control protein) 结合, 后者能直接结合并活化 APC(anaphase-promoting complex), 而 APC 的活化是哺乳动物细胞分裂后期开始和细胞分裂完成所必需的, hsMAD2 的功能在于当其与 CDC20 结合后, 抑制 CDC20 对 APC 的活化, 从而引起细胞停滞在分裂的中 - 后期, 使细胞周期受阻<sup>[27, 28]</sup>。理论上, 纺锤体组装关卡失常可导致复制后的染色体在两个子细胞中分布不均, 即产生非整倍体, 并导致基因组不稳定性, 多基因突变的原因可能即在于此。据此我们推测, 在 HCC 的发生演进过程中, 由于细胞周期调控发生紊乱或存在其他机制, 造成 hsMAD2 的表达水平降低甚至缺失表达, 致使其关卡功能削弱或丧失, 从而引起其间接抑制 APC 活化的功能减弱或丧失, 如果细胞在分裂过程中存在某种错误, 也不会在此关卡处停滞下来, 而是按照错误的方式继续分裂下去, 继而引起细胞染色体组的不稳定, 甚至发生癌变。hREV7 能与 hsMAD2 结合, 前者的过表达不引起细胞周期的停留<sup>[29]</sup>。GM-CSF(粒 - 巨细胞集落刺激因子)也可能通过与 MAD2 作用参与调节细胞周期 M 期关卡<sup>[30]</sup>。总之, 这类基因与肿瘤的关系值得我们注目。

#### 4 参考文献

- 1 吴孟超. 我国肝脏外科学研究回顾. 世界华人消化杂志 2000;8:1201-1204
- 2 傅建民, 余小舫, 邵永孚. 端粒酶与原发性肝癌. 世界华人消化杂志 2000;8:461-463
- 3 翟守恒, 刘俊彬, 刘云梅, 张玲莉, 杜志平. HBsAg, HCV - Ag 和 AFP 在肝硬化和肝细胞癌组织中的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:524-527
- 4 苏英豪, 朱世能, 陆世伦, 顾映红. 肝细胞癌组织中 HCV 基因型的逆转录原位 PCR 检测. 世界华人消化杂志 2000;8:874-878
- 5 唐有为, 姚希贤. 肝癌细胞对星状细胞活化的调控作用. 世界华人消化杂志 2001;9:202-204
- 6 崔俊, 杨冬华, 覃汉荣. 肝癌中 c - fms 癌基因突变及其临床意义. 世界华人消化杂志 2001;9:392-395
- 7 程虹, 刘彦仿, 张惠中, 沈万安, 张素珍. 分泌型抗肝癌单链双功能抗体融合 GFP 真核表达载体的构建及表达. 世界华人消化杂志 2001;9:640-644
- 8 蒋业贵, 王宇明, 李奇芬. HLA - DR 抗原和 HSP70 在肝细胞癌中的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1139-1142
- 9 戚跃勇, 邹利光, 王文献, 陈卫军, 熊坤林, 赵晓晏, 杨彤翰, 易习之. 肝细胞肝癌合并门静脉癌栓的双期增强螺旋 CT 诊断. 世界华人消化杂志 2002;10:384-387
- 10 田雪梅, 张展霞. 白藜芦醇抗肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤的活性. 世界华人消化杂志 2001;9:161-164
- 11 曲波, 李宝杰, 吕志武, 潘海乐. 细针肝穿刺标本检测端粒酶诊断肝癌的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:538-541
- 12 郑建勇, 李开宗, 王为忠. 肝癌组织中 p27<sup>KIP1</sup> 基因的表达及其与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:883-886
- 13 胡沛臻, 张传山, 马福成, 杨守京, 王文亮. 肝细胞肝癌组织中 p21<sup>WAF1/CIP1</sup> 与 PCNA 的表达及意义. 世界华人消化杂志 2002;10:145-148
- 14 郭晓钟, 邵晓冬, 徐建华, 赵佳钧, 李宏宇, 王迪. 肝癌组织中 bcl - xL mRNA 的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:530-532
- 15 Tang ZY, Sun FX, Tian J, Ye SL, Liu YK, Liu KD, Xue Q, Chen J, Xia JL, Qin LX, Sun HC, Wang L, Zhou J, Li Y, Ma ZC, Zhou XD, Wu ZQ, Lin ZY, Yang BH. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential. *World J Gastroenterol* 2001;7:597-601
- 16 Wang ZX, Hu GF, Wang HY, Wu MC. Expression of liver cancer associated gene HCCA3. *World J Gastroenterol* 2001;7:821-825
- 17 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 18 Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001;7:542-546
- 19 Huang XF, Wang CM, Dai XW, Li ZJ, Pan BR, Yu LB, Qian B, Fang L. Expressions of chromogranin A and cathepsin D in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:693-698
- 20 梁云, 陆斌, 崔贞福, 李晓冬, 郭亚军, 刘彦君. 肝细胞癌中 Fas/FasL 表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1364-1368
- 21 Tanaka K, Nishioka J, Kato K, Nakamura A, Mouri T, Miki C, Kusunoki M, Nobori T. Mitotic checkpoint protein hsMAD2 as a marker predicting liver metastasis of human gastric cancers. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:952-958
- 22 Percy MJ, Myrie KA, Neeley CK, Azim JN, Ethier SP, Petty EM. Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:356-362
- 23 Hernando E, Orlow I, Liberal V, Nohales G, Benezra R, Cordon-Cardo C. Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hsMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int J Cancer* 2001;95:223-227
- 24 Wang X, Jin DY, Ng RW, Feng H, Wong YC, Cheung AL, Tsao SW. Significance of MAD2 expression to mitotic checkpoint control in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:1662-1668
- 25 Wang X, Jin DY, Wong YC, Cheung AL, Chun AC, Lo AK, Liu Y, Tsao SW. Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2000;21:2293-2297
- 26 张晓晖, 黄高升, 谢学军, 李擒龙. 急性白血病中有丝分裂关卡基因 hsMAD2 表达的分析. 第四军医大学学报 2002;23:1570-1573
- 27 Zhang Y, Lees E. Identification of an overlapping binding domain on Cdc20 for Mad2 and anaphase-promoting complex: model for spindle checkpoint regulation. *Mol Cell Biol* 2001;21:5190-5199
- 28 Luo X, Fang G, Coldiron M, Lin Y, Yu H, Kirschner MW, Wagner G. Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat Struct Biol* 2000;7:224-229
- 29 Murakumo Y, Roth T, Ishii H, Rasio D, Numata S, Croce CM, Fishel R. A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. *J Biol Chem* 2000;275:4391-4397
- 30 Takeda M, Dohmae N, Takio K, Arai K, Watanabe S. Cell cycle-dependent interaction of Mad2 with conserved Box1/2 region of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor common betac. *J Biol Chem* 2001;276:41803-41809



# GnRH类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究

刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙 岚, 黄鲁豫, 张远强

刘庆元, 窦科峰, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科  
陕西省西安市 710033  
张金山, 孙岚, 张远强, 中国人民解放军第四军医大学基础部组织学与  
胚胎学教研室 陕西省西安市 710033  
黄鲁豫, 中国人民解放军第四军医大学西京医院全军创伤骨科研究所  
陕西省西安市 710033  
刘庆元, 男, 1966-08-15 生, 青海省西宁市人, 汉族, 主治医师。  
国家自然科学基金资助课题, No. 39900142  
项目负责人: 张金山, 710033, 陕西省西安市长乐西路 169 号, 中国人民解放军第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室. jszhang@fmmu.edu.cn  
电话: 029-3374511 传真: 029-3374512  
收稿日期: 2003-04-15 接受日期: 2003-06-02

## Gonadotropin hormone-releasing hormone analog induces apoptosis in human hepatocarcinoma cell *in vitro*

Qing-Yuan Liu, Ke-Feng Dou, Jin-Shan Zhang, Lan Sun,  
Lu-Yu Huang, Yuan-Qiang Zhang

Qing-Yuan Liu, Ke-Feng Dou, Department of Hepato-Biliary Surgery  
of Xijing hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033,  
Shaanxi Province, China  
Jin-Shan Zhang, Lan Sun, Yuan-Qiang Zhang, Teaching and Research  
Section of Histology and Embryology, Fourth Military Medical  
University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Lu-Yu Huang, Institute of Orthopaedics of Chinese PLA, Xijing Hospital,  
Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No.  
39900142  
Correspondence to: Jin-Shan Zhang, Teaching and Research Section  
of Histology and Embryology, Fourth Military Medical University, 169  
Changle West Road, Xi'an 710032, China. jszhang@fmmu.edu.cn  
Received: 2003-04-15 Accepted: 2003-06-02

## Abstract

**AIM:** To induce apoptosis of human cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cell line SMMC-7721 by GnRH-analog alarelin, and to provide the experimental evidence for GnRH-A in endocrinotherapy of HCC.

**METHODS:** MTT assay, transmission electron microscopy and DNA end labeling method were used to identify apoptosis of cultured human hepatocellular carcinoma cells treated by alarelin.

**RESULTS:** SMMC-7721 cell line was induced by alarelin in  $10^{-9}$  mol/L concentration. The induction of apoptosis was dose-effect dependent. Under electron microscopy we could identify the earlier and later stage of apoptotic cells, and chromatin condensation, as well as apoptosis body formation. DNA end labeling method showed that alarelin could induce apoptosis of HCC cells ( $0.29 \pm 0.06$  vs  $0.11 \pm 0.03$ ), and their apoptosis body formations were observed. Compared with control group, the TUNEL index was increased significantly

in alarelin treated groups ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** GnRH-analog alarelin can induce apoptosis of cultured human HCC cell line SMMC-7721, and it plays a potential role in the treatment of human HCC.

Liu QY, Dou KF, Zhang JS, Sun L, Huang LY, Zhang YQ. Gonadotropin hormone-releasing hormone analog induces apoptosis in human hepatocarcinoma cell *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1329-1332

## 摘要

**目的:** 研究GnRH类似物阿拉瑞林诱导体外培养的人肝癌细胞株 SMMC-7721 发生凋亡的作用, 为 GnRH 类似物用于肝癌的内分泌治疗提供实验资料。

**方法:** 采用MTT法、形态学透射电镜观察和末端脱氧核苷酸标记法观察被阿拉瑞林处理后的SMMC-7721细胞的形态学和生化等指标的变化。

**结果:** MTT 法研究结果表明阿拉瑞林在  $10^{-9}$  mol/L 浓度时即可诱导 7721 细胞凋亡, 并呈量 - 效效应。透射电镜下可观察到早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞以及核染色质浓缩并见凋亡小体。末端脱氧核苷酸转移标记法进一步证实阿拉瑞林可以诱导肝癌细胞凋亡并可见凋亡小体; 与对照组相比, 阿拉瑞林处理后TUNEL凋亡指数显著增加( $0.29 \pm 0.06$  vs  $0.11 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** GnRH类似物可诱导体外培养的肝癌细胞株SMMC-7721 发生凋亡, 从而提示 GnRH 类似物对人肝细胞性肝癌具有潜在的治疗作用。

刘庆元, 窦科峰, 张金山, 孙岚, 黄鲁豫, 张远强. GnRH 类似物诱导肝癌细胞凋亡的体外研究. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1329-1332  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1329.asp>

## 0 引言

促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing-hormone-analog, GnRH)对垂体外的多种外周组织的生理功能均有调节作用<sup>[1-3]</sup>。已有研究表明, 乳腺、前列腺、卵巢、垂体和胰腺发生的肿瘤细胞上有 GnRH 结合点, 促性腺激素释放激素类似物(GnRH-A)可抑制这些肿瘤的生长。实验研究和临床观察均提示肝癌可能是一种性激素依赖性肿瘤, 有文献报道体外培养的人肝癌细胞上有 GnRH 受体, GnRH 对该细胞系有生长抑制作用, 肝癌的发生、发展过程与细胞凋亡有十分密切的关系<sup>[4-17]</sup>。为探讨 GnRH-A 对肝癌细胞生长抑制作用的机制, 我们采用

体外细胞培养技术,用MTT试验、电镜观察和TUNEL技术研究GnRH类似物-阿拉瑞林对肝癌细胞SMMC-7721增生和凋亡的影响,以期为深入研究GnRH在肝癌细胞增生调控的作用机制和将GnRH类似物用于肝癌的内分泌治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞株SMMC-7721由本校细胞工程中心提供。培养于含100mL/L小牛血清(华美公司)的RPMI1640(Gibco公司)培养液中,37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养。阿拉瑞林为白色粉末,上海丽珠东风生物技术有限公司产品,使用前用RPMI1640培养液配制成所需浓度。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞毒性MTT实验** 将对数生长期的SMMC-7721细胞记数后调整细胞浓度为 $1 \times 10^4$ 接种到96孔培养板,100 μL/孔,每组3孔,细胞贴壁后,每孔分别加入 $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ 及 $10^{-10}$  mol/L不同浓度的阿拉瑞林继续培养48 h,以培养液为生存对照组,每孔加5 mg/L MTT (Sigma公司) 50μL,再培养4 h,然后加入DMSO150/孔,振荡5 min后用酶标仪(490 nm)测定各孔的A值,求出肿瘤细胞生长抑制率 $= (1 - \text{加药组A值} / \text{生存对照组A值}) \times 100\%$ 。

**1.2.2 末端脱氧核苷酸转移标记TUNEL法** 分别将浓度为 $10^{-10}$ 和 $10^{-5}$  mol/L阿拉瑞林处理SMMC-7721细胞48 h后,消化并制成细胞悬液移入6孔培养板中,放入盖玻片,培养至细胞贴壁,玻片经40 g/L多聚甲醛固定30 min,0.01 mol/L PBS漂洗3次,按细胞凋亡检测试剂盒(博士德公司)说明书操作。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞,可见胞核裂解,并可见凋亡小体。光镜下观察,计算TUNEL指数(阳性细胞数/总细胞数)。

**1.2.3 凋亡形态学观察** 收集经阿拉瑞林处理后细胞,离心沉淀,常规固定,透射电镜观察,照相。

统计学处理 用精确 $\chi^2$ 检验分析实验数据,  $P < 0.05$ 为有显著差异。

## 2 结果

**2.1 MTT法检测** 随着阿拉瑞林浓度的升高,对7721细胞的抑制率也增大,呈剂量依赖型(表1)。

**2.2 TUNEL法检测** 光镜下观察,可见肝癌部分细胞呈TUNEL阳性反应,阳性物质呈棕黄色颗粒主要位于胞核内,且多有胞核形态改变,体积变小、呈肾形(图1)。对照组、 $10^{-10}$  mol/L和 $10^{-5}$  mol/L阿拉瑞林处理组SMMC-7721细胞的TUNEL指数分别为 $0.11 \pm 0.03$ ;  $0.29 \pm 0.06$ 和 $0.26 \pm 0.04$ 。两经阿拉瑞林处理组与对照组之间均具有显著性差异( $P < 0.05$ );  $10^{-10}$  mol/L和 $10^{-5}$  mol/L阿拉瑞林处理组间未见明显差异( $P > 0.05$ )。

**2.3 透射电镜观察** 电镜下可见部分细胞体积缩小,核

固缩,染色体密集于核膜下。部分细胞表现为核膜消失,染色体断裂,核分裂成碎片,在胞质中与退变的细胞器等成分一起,形成凋亡小体(图2)。

表1 阿拉瑞林对SMMC-7721肝癌细胞增生活性影响的MTT试验结果( $\bar{x} \pm s$ )

GnRH-A 浓度 (mol/L)	A 值	抑制率(%)
$1.0 \times 10^{-5}$	$0.19 \pm 0.13$	$69.96 \pm 1.15$
$1.0 \times 10^{-6}$	$0.25 \pm 0.14$	$58.22 \pm 0.78$
$1.0 \times 10^{-7}$	$0.38 \pm 0.13$	$51.65 \pm 0.53$
$1.0 \times 10^{-8}$	$0.35 \pm 0.10$	$45.13 \pm 2.47$
$1.0 \times 10^{-9}$	$0.48 \pm 0.11$	$28.59 \pm 1.72$
$1.0 \times 10^{-10}$	$0.54 \pm 0.12$	$15.78 \pm 3.58$
0.0 (对照)	$0.62 \pm 0.15$	-

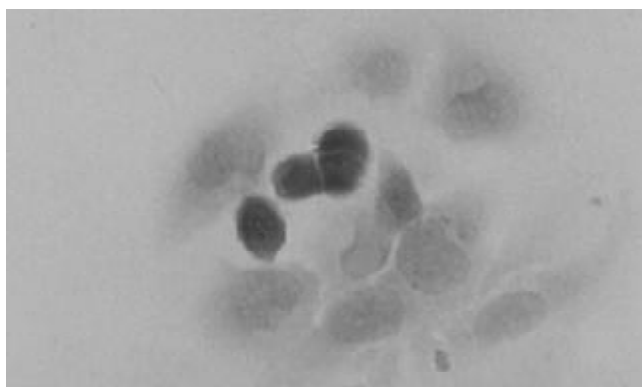


图1 肝癌细胞TUNEL染色阳性  $\times 400$ 。

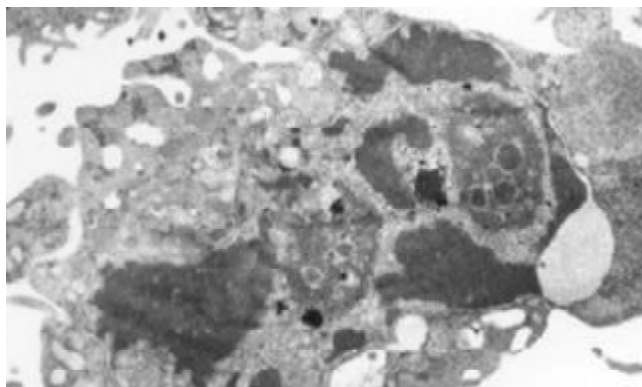


图2 肝癌细胞中凋亡小体  $\times 8700$ 。

## 3 讨论

目前肝癌仍是严重威胁人类生命的主要疾病之一,手术切除肿瘤仍为肝癌众多治疗方案中首选,但许多肝癌患者在确诊时已属于中晚期,从而丧失了手术机会,作为保守治疗的化疗和放疗的效果不佳、毒副作用大<sup>[18-21]</sup>。近年来肿瘤的内分泌治疗作为一种高效低毒的治疗方法,正引起肿瘤病理学家和临床医师的重视。已有的研究表明,乳腺、肺、结肠、子宫、肾脏和胰腺等组织发生的肿瘤细胞上均有GnRH结合位点,GnRH类似物(GnRH-A)可抑制这些肿瘤细胞的生长<sup>[22-24]</sup>。传统观点认

为, GnRH 类似物对促性腺激素的降调节作用以及其所引起的甾体激素水平下降是 GnRH-A 被引入激素依赖性肿瘤治疗的理论基础; 然而最近的研究发现, GnRH-A 对多种恶性肿瘤细胞的生长可能具有直接的抑制作用<sup>[25]</sup>. GnRH 类似物包括 GnRH 激动剂及拮抗剂, 阿拉瑞林为人工合成的促性腺激素释放激素的九肽类似物, 为 GnRH 激动剂, 一些研究资料已经表明阿拉瑞林对多种肿瘤有一定的治疗作用, 但其作用机制尚不十分清楚. 我们的研究已经证明人肝癌组织细胞上有 GnRH 受体<sup>[26]</sup>. 我们用体外细胞培养技术观察了 LHRH-A 对人肝癌细胞系 SMMC-7721 生长的影响, MTT 细胞毒性实验结果表明, GnRH-A 对 SMMC-7721 细胞活性的抑制作用呈剂量依赖性, 将不同浓度的阿拉瑞林( $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  mol/L) 作用于 SMC-7721 细胞株培养 48 h, 在低浓度  $10^{-9}$  mol/L 时即对细胞有抑制作用, 且随着浓度的增高, 抑制作用增强, 表明阿拉瑞林对体外培养 SMC-7721 人肝癌细胞株有直接抑制作用, 且呈剂量依赖效应. 根据这一实验结果, 我们观察了  $10^{-10}$  和  $10^{-5}$  mol/L 两种不同浓度 GnRH-A 对肝癌细胞凋亡指标的影响. 应用形态学观察和末端脱氧核苷酸转移标记法证实, 阿拉瑞林作用后 SMC-7721 细胞出现了细胞凋亡的典型生化和形态学特征.

迄今已有大量探讨肝癌细胞增生与凋亡机制的研究报道<sup>[27-32]</sup>. GnRH 与性激素依赖性肿瘤细胞的增生调控有关, GnRH 类似物已用于这些肿瘤的临床治疗. Yin et al<sup>[22]</sup> 利用 RT-PCR 技术和 Southern 杂交法证明, 在人卵巢癌、肝癌(Hep G2)及绒毛膜癌 (JEG-3) 等细胞中均有 GnRH 基因的表达. 另外 Pati et al<sup>[33]</sup> 也证实人肝癌细胞系 HepG2 和 HuH7 中有 GnRH 受体存在, 并且不同分子类型的 GnRH 对这两种细胞系的生长有抑制作用. 我们先前的研究表明<sup>[34]</sup>, GnRH-A 具有显著的体内抗肝癌细胞增生活性, 瘤内注射 LHRH-A 治疗使瘤体明显缩小, 治疗 3 wk 后, 抑瘤率可达 57.7 %, 并且治疗组裸鼠的平均生存期明显延长; GnRH-A 可使体外培养的 hHCC 和 FSK-7902 肝癌细胞 Bax 蛋白表达增加, 说明 LHRH-A 对肝癌细胞增生的调控与 Bax 有关. Westphalen et al<sup>[35]</sup> 比较了阿霉素和 AN-152 (LHRH 类似物与阿霉素的连接体) 对人卵巢癌细胞生长的抑制效应, 发现 AN-152 对 LHRH 受体阳性卵巢癌细胞(EFO-21, EFO-27)生长的抑制效应显著高于阿霉素, 并且过量的 LHRH 受体激动剂可阻断 AN-152 的作用; 激光扫描显微镜观察到 AN-152 和阿霉素在癌细胞内的积聚; 而在 LHRH 受体阴性卵巢癌细胞(SKOV-3), AN-152 的效应则不及阿霉素, 并且癌细胞内也未发现有 AN-152 积聚, 这说明 AN-152 对卵巢癌细胞增生的抑制作用是由 LHRH 受体介导的. 综合本研究结果及已有资料, 我们推测 GnRH-A 抑制肝癌细胞增生的效应可能是由其受体介导的, 当 GnRH-A 与肝癌细胞上的特异性受体结合后, 启动受体介导的信号传递系统, 促使凋亡基因

开放和表达, 从而使癌细胞周期分布改变, 引发细胞凋亡.

#### 4 参考文献

- 1 Casan EM, Raga F, Bonilla-Musoles F, Polan ML. Human oviductal gonadotropin-releasing hormone: possible implications in fertilization, early embryonic development, and implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1377-1381
- 2 Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Watanabe Y, Ito M, Nomura S, Itakura A, Tsujimoto M, Mizutani S. Possible involvement of placental peptidases that degrade gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the dynamic pattern of placental hCG secretion via GnRH degradation. *Placenta* 2002;23:483-489
- 3 Terasawa E, Busser BW, Luchansky LL, Sherwood NM, Jennes L, Millar RP, Glucksman MJ, Roberts JL. Presence of luteinizing hormone-releasing hormone fragments in the rhesus monkey forebrain. *J Comp Neurol* 2001;439:491-504
- 4 Yager JD, Zurlo J, Ni N. Sex hormone and tumor promotion in liver. *Prog Soc Exp Bio Med* 1991;198:667-674
- 5 Matsumoto T, Takagi H, Mori M. Androgen dependency of hepatocarcinogenesis in TGFalpha transgenic mice. *Liver* 2000;20:228-233
- 6 Guo XZ, Shao XD, Xu JH, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Expression of bcl-xL mRNA in hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:530-532
- 7 Zheng JY, Li KZ, Wang WZ. Impact of the expression of p27<sup>KIP1</sup> on apoptosis and progression of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:883-886
- 8 Hu ZY, Hu XQ, Zhu SN, Gu YH. Expression of smad2/3 in experimental rat hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:283-286
- 9 Hu PZ, Zhang CS, Ma FC, Yang SJ, Wang WL. Expressions of cyclin-dependent kinase inhibitor P21<sup>WAF1/CIP1</sup> and PCNA in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:145-148
- 10 Qian J, Truebenbach J, Graepler F, Pereira P, Huppert P, Eul T, Wiemann G, Claussen C. Application of poly-lactide-co-glycolide-microspheres in the transarterial chemoembolization in an animal model of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:94-98
- 11 Liao C, Zhao MJ, Zhao J, Song H, Pineau P, Marchio A, Dejean A, Tiollais P, Wang HY, Li TP. Mutation analysis of novel human liver-related putative tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:89-93
- 12 Huang JZ, Xia SS, Ye QF, Jiang HY, Chen ZH. Effects of p16 gene on biological behaviour in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:84-88
- 13 Ou-Yang GL, Li QF, Peng XX, Liu QR, Hong SG. Effects of tachyplesin on proliferation and differentiation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1053-1058
- 14 Liao C, Zhao MJ, Zhao J, Jia D, Song H, Li ZP. Over-expression of LPTS-L in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 induces crisis. *World J Gastroenterol* 2002;8:1050-1052
- 15 Wang X, Liu FK, Li X, Li JS, Xu GX. Retrovirus-mediated gene transfer of human endostatin inhibits growth of human liver carcinoma cells SMMC7721 in nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:1045-1049
- 16 Zeng WJ, Liu GY, Xu J, Zhou XD, Zhang YE, Zhang N. Pathological characteristics, PCNA labeling index and DNA index in prognostic evaluation of patients with moderately differentiated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1040-1044
- 17 Jin J, Huang M, Wei HL, Liu GT. Mechanism of 5-fluorouracil required resistance in human hepatocellular carcinoma cell line Bel(7402). *World J Gastroenterol* 2002;8:1029-1034
- 18 Chen Q, Yang GW, An LG. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by Ginkgo biloba seed polysaccharide. *World J Gastroenterol* 2002;8:832-836

- 19 Zhang RG, Guo LX, Wang XW, Xie H. Telomerase inhibition and telomere loss in BEL-7404 human hepatoma cells treated with doxorubicin. *World J Gastroenterol* 2002;8:827-831
- 20 Niu ZS, Li BK, Wang M. Expression of p53 and C-myc genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:822-826
- 21 Jiang HC, Liu LX, Piao DX, Xu J, Zheng M, Zhu AL, Qi SY, Zhang WH, Wu LF. Clinical short-term results of radiofrequency ablation in liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:624-630
- 22 Yin H, Cheng KW, Hwa HL, Peng C, Auersperg N, Leung PC. Expression of the messenger RNA for gonadotropin-releasing hormone and its receptor in human cancer cell lines. *Life Sci* 1998;62:2015-2023
- 23 Nechushtan A, Yarkoni S, Marianovsky I, Lorberboum-Galski H. Adenocarcinoma cell are targeted by the new GnRH-PE<sub>66</sub> chimeric toxin through specific gonadotropin-releasing hormone binding sites. *J Biol Chem* 1997;272:11597-11603
- 24 Mittan D, Lee S, Miller E, Perez RC, Basler JW, Bruder JM. Bone loss following hypogonadism in men with prostate cancer treated with GnRH analogs. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3656-3661
- 25 Yang WH, Wiczorock M, Allen MC, Nett TM. Cytotoxic activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-pokeweed antiviral protein conjugates in cell lines expressing GnRH receptors. *Endocrinology* 2003;144:1456-1463
- 26 Zhang J, Huang G, Huang W. Gonadotropin releasing hormone and its receptor in the tissue of human hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1998;78:343-346
- 27 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 28 Li MS, Li PF, He SP, Du GG, Li G. The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line. *World J Gastroenterol* 2002;8:469-475
- 29 Liu LX, Jiang HC, Piao DX. Radiofrequency ablation of liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:393-389
- 30 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 31 Yang JY, Luo HY, Lin QY, Liu ZM, Yan LN, Lin P, Zhang J, Lei S. Subcellular daunorubicin distribution and its relation to multidrug resistance phenotype in drug-resistant cell line SMMC-7721/R. *World J Gastroenterol* 2002;8:644-649
- 32 Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657
- 33 Pati D, Habibi HR. Inhibition of human hepatocarcinoma cell proliferation by mammalian and fish gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology* 1995;136:75-84
- 34 Zhang JS, Wang H, Huang WQ, Sun L, Huang GS, Zhang YQ. Growth inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone analog on hHCC hepatocarcinoma cell xenografts in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:759-764
- 35 Westphalen S, Kotulla G, Kaiser F, Krauss W, Werning G, Elsasser HP, Nagy A, Schulz KD, Grundker C, Schally AV, Emons G. Receptor mediated antiproliferative effects of the cytotoxic LHRH agonist AN-152 in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol* 2000;17:1063-1069

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 欢迎订阅 2004 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学情报研究所 (ISI), 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为 WJG® 影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 44 种, 其中包括 WJG®. Current Contents/Clinical Medicine® (即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 36 种, 其中包括 WJG®. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病学杂志 43 种, 其中包括 WJG®. WJG® 由 122 位胃肠病学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区, 其中包括 53 个国家的胃肠病学会主席. 53 个国家和地区胃肠病学会为 WJG® 的合作伙伴. WJG® 被美国《医学索引》(Index Medicus / MEDLINE)、美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EMBASE/Excerpta Medica, EM) 和俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科学引文索引, 中国科技论文统计与分析, 世界消化学网数据库, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG®, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. WJG® 在众多消化类期刊中唯一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG® 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2004 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjg@wjgnet.com <http://www.wjgnet.com>

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)



# bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控

于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧

于卉影, 孙黎光, 中国医科大学生物化学教研室 辽宁省沈阳市 110001  
孙利平, 沈阳市第七人民医院内科 辽宁省沈阳市 110003  
丁晓慧, 日本三重大学医学部解剖学第二讲座博士  
于卉影, 女, 1972-07-26 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 1994 年沈阳医学院医学系毕业, 2000 年中国医科大学硕士毕业, 现为中国医科大学细胞生物学博士研究生, 主要从事细胞信号转导与细胞周期调控的研究. 工作单位在沈阳军区总医院医学实验科.  
国家自然科学基金资助课题, No. 39870384  
项目负责人: 孙黎光, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学生物化学教研室.  
电话: 024-23256666-5297  
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

## Effect of basic fibroblast growth factor on growth regulation in Bel-7402 cell line

Hui-Ying Yu, Li-Ping Sun, Li-Gung Sun, Xiao-Hui Ding

Hui-Ying Yu, Li-Gung Sun, Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Li-Ping Sun, Department of Gastroenterology, Shenyang No.7 People's Hospital, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Xiao-Hui Ding, Department of Anatomy, School of Medicine, Mie University, Japan  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39870384  
Correspondence to: Li-Guang Sun, Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China.  
Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-08

## Abstract

AIM: To investigate whether bFGF regulates p21<sup>WAF1</sup> expression of Bel-7402 cell line via PI3K/PKB pathway.

METHODS: <sup>32</sup>P incorporation assay. The expression of p21<sup>WAF1</sup>-mRNA was assessed by RT-PCR. The expression of p21<sup>WAF1</sup> protein was detected by Western blot. Cell cycle analysis was performed on a FACScan.

RESULTS: Both membrane and cytosol activity of PKB in Bel-7402 cell which were treated with bFGF (25 µg/L) reached the peak at 10 min. p21<sup>WAF1</sup> mRNA level was upregulated and peaked at 1 h (5.5 fold induction). Correspondingly, p21<sup>WAF1</sup> expression was increased and peaked at 2 h (2.2 folds of reduction). Wortmannin efficiently inhibited the activity of PKB ( $P < 0.05$ ), but not the level of p21<sup>WAF1</sup> mRNA and the expression of p21<sup>WAF1</sup> protein. FCM analysis showed bFGF induced S-phase entry ( $0.14 \pm 0.01 \rightarrow 0.28 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), which was inhibited by wortmannin effectively ( $0.28 \pm 0.01 \rightarrow 0.22 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: bFGF stimulates the proliferation of Bel-7402 cell line via PI3K/PKB pathway, and modulates p21<sup>WAF1</sup> expression through separating signaling pathways.

Yu HY, Sun LP, Sun LG, Ding XH. Effect of basic fibroblast growth factor on growth regulation in Bel-7402 cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1333-1336

## 摘要

目的: 探讨bFGF是否通过PI3K/PKB途径调节p21<sup>WAF1</sup>的表达.

方法: <sup>32</sup>P 掺入法检测 PKB 酶活性, RT-PCR、Western blot 检测不同处理组 Bel-7402 细胞的 p21<sup>WAF1</sup> 表达, 流式细胞术分析细胞周期.

结果: 25 µg/L bFGF 刺激细胞 10 min, 就可使胞液和膜性 PKB 酶活性达高峰. p21<sup>WAF1</sup> mRNA 表达水平在 1 h 达高峰, 比对照升高了 5.5 倍. p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达在 2 h 达高峰, 比对照升高了 2.2 倍. wortmannin 预处理后, PKB 活性在各时间点均明显降低( $P < 0.05$ ), p21<sup>WAF1</sup> mRNA 表达及 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达无明显变化. 流式细胞术分析显示, bFGF 处理组与对照组相比 G1 期细胞减少( $0.65 \pm 0.01 \rightarrow 0.49 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ), S 期细胞增多( $0.14 \pm 0.01 \rightarrow 0.28 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), wortmannin 能抑制此促增生作用(G1:  $0.58 \pm 0.01$ ; S:  $0.22 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ).

结论: PI3K/PKB 途径可介导 bFGF 对 Bel-7402 细胞的促增生作用, 但是 bFGF 对 p21<sup>WAF1</sup> 表达的调节作用不依赖 PI3K/PKB 途径.

于卉影, 孙利平, 孙黎光, 丁晓慧. bFGF 对人肝癌细胞系 Bel-7402 的生长调控. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1333-1336  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1333.asp>

## 0 引言

成纤维细胞生长因子(FGFs)和成纤维细胞生长因子受体的信号转导通路与肿瘤发生发展的关系极为密切, 是细胞信号转导研究的热点<sup>[1-20]</sup>. PI3K/PKB 是近年来发现的一个新的生长因子信号转导途径. 越来越多的证据表明, PKB 与细胞代谢, 生长、凋亡、恶变等密切相关<sup>[21-29]</sup>. p21<sup>WAF1</sup> 是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白<sup>[30-32]</sup>, 他通过依赖和非依赖 P53 途径, 对细胞内信号和细胞外信号均能作出反应, 参与细胞生长、发育、分化、衰老及 DNA 损伤修复等多种功能的调节<sup>[33-35]</sup>. 我们采用外源性 bFGF 直接作用于 Bel-7402 肝癌细胞, 观察其对 p21<sup>WAF1</sup> 表达的影响, 探讨生长因子通过 PKB 途径调控细胞周期进程的信号转导机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 Bel-7402 购自是中科院上海细胞所, DMEM 培养基为 Gibco 公司产品, 小牛

血清购自华美生物工程公司, TRIzol 为 Life-Technology 公司产品, 扶济复(重组人 bFGF)购自北京双鹭药业有限公司, 组蛋白 2B 为 Roche 公司产品, cAMP 蛋白激酶抑制剂为 Sigma 公司产品,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 购于北京福瑞生物工程公司, 单克隆鼠抗人 p21<sup>WAF1</sup>、辣根过氧化物酶标记的二抗和 ECL 试剂盒购于北京中山生物技术公司, TaKaRa RNA PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1  $^{32}\text{P}$  掺入法检测 PKB 酶活性** 将对数生长期细胞  $1 \times 10^8/\text{L}$ , 接种于培养瓶, 待达到 70 % 融合时换成无血清 DMEM 培养液孵育过夜, 使细胞同步化, 然后随机按下述时间点和浓度点分组施加因素。分组如下: (1) 不同剂量组: 0, 25, 50, 75  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 处理时间 10 min; (2) 不同时间组: 0, 5, 10, 60 min, 剂量为 25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ; (3) wortmannin 预处理组: 处理时细胞同步化同前, 空白对照以等量二甲基亚砜替代 wortmannin, 加入 wortmannin 终浓度 100 nmol/L, 置于细胞培养箱中孵育 1 h, 然后按(2)的各时间点加 bFGF 处理。处理期间细胞置于细胞培养箱中。处理结束后, 收集细胞, 用冰 PBS 洗涤 3 次。按照文献[36]方法进行 PKB 酶活性检测。

**1.2.2 Western blot 分析** 取各组细胞 40  $\mu\text{g}$  总蛋白上样于 150 g/L SDS - PAGE 电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜上, 加入一抗, 孵育 2 h, 洗膜, 加入羊抗鼠辣根过氧化物酶标二抗, 孵育 2 h, 按 ECL 免疫印迹检测试剂盒说明进行显色、曝光。分组如下: (1) bFGF 组: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 剂量为 25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ; (2) wortmannin+bFGF 组: 先加入 100 nmol/L wortmannin, 孵育 1 h, 然后按(1)的各时间点加 bFGF 处理。

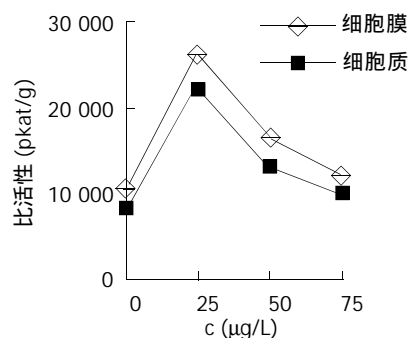
**1.2.3 RT-PCR 检测 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 表达** 应用 primer Primer5 软件设计引物, 由大连宝生物工程有限公司合成, p21<sup>WAF1</sup>: 上游引物 5' -ACTTTGTCACCGAGACACA-3'; 下游引物 5' -CCTCAGCCTTCCAAGTAGC-5'。 $\beta$ -actin: 上游引物 5' -GATGACCCAGATCATGTTTG-3'; 下游引物 5' -TGGAGTTGAAGGTAGTTTCG-3'。按 Trizol 试剂操作说明提取各处理组细胞的总 RNA。紫外检测仪分别在 260 nm 和 280 nm 波长下检测 RNA 的吸光度 A 值, 测定 RNA 的纯度。cDNA 合成后, 建立 25  $\mu\text{L}$  反应体系, 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 90 s, 循环 28 次, 循环条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min。循环结束后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪扫描摄影。分组如下: (1) bFGF 组: 0, 30 min, 1 h, 2 h, 剂量为 25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ; (2) wortmannin+bFGF 组: 先加入 100 nmol/L wortmannin, 孵育 1 h, 然后按(1)的各时间点加 bFGF 处理。

**1.2.4 细胞周期分析** 收集消化的贴壁细胞, 离心后重悬在含 100 mg/L RNA 酶和 10 g/L 碘化丙啶的 PBS 中, 用 FACScan 检测, 结果用 Cell-Quest 软件分析数据。

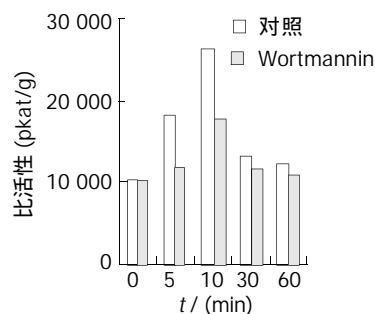
统计学处理 差异显著性采用 t 检验。

## 2 结果

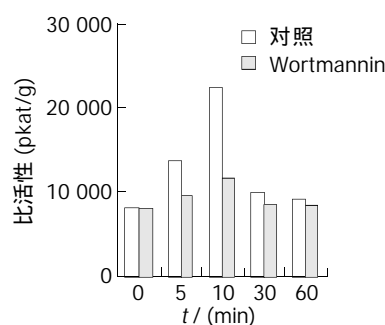
**2.1 bFGF 激活 PKB 活性** 采用外源性 bFGF 刺激细胞, 检测 PKB 酶活性, 计算比活性值绘制浓度曲线(图 1A)和时间曲线(图 1B, C)。结果发现, 不同浓度的 bFGF 孵育 Bel-7402 细胞迅速激活 PKB, 且膜性 PKB 活性高于胞液 PKB 活性。25  $\mu\text{g}/\text{L}$  bFGF 刺激细胞 10 min, 就可使胞液和膜性 PKB 酶活性达高峰。



A 浓度曲线。

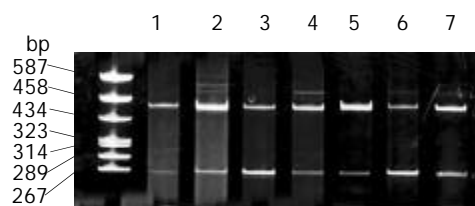


B 胞膜 PKB 活性。



C 胞液 PKB 活性。

图 1 bFGF 对 Bel-7402 细胞 PKB 活性的影响。



1: 对照; 2, 3, 4: bFGF 分别孵育 0.5, 1, 2 h; 5, 6, 7: wortmannin 预处理 1 h 后 bFGF 分别孵育 0.5, 1, 2 h。

图 2 RT-PCR 分析 bFGF 对 p21<sup>WAF1</sup> 表达的影响。

**2.2 bFGF 对 p21<sup>WAF1</sup> 转录和表达的影响** 经 25  $\mu\text{g}/\text{L}$  bFGF 处理后, Bel-7402 细胞 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 表达水平增高(见图 2), 在 1 h 达高峰, 与对照相比升高了 5.5 倍。Western

blot 分析显示, 经 25  $\mu\text{g/L}$  bFGF 处理后, Bel-7402 细胞的 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达增加, 在 2 h 达高峰, 与对照相比升高了 2.2 倍 (图 3)。

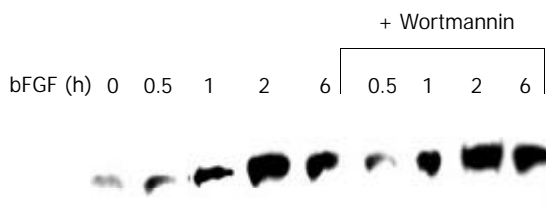


图3 bFGF 对 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达的影响。

**2.3 PI3K 抑制剂对 bFGF 作用的影响** 经 PI3K 抑制剂 wortmannin 预处理与未经预处理的各组相比, PKB 活性在各时间点均存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), p21<sup>WAF1</sup> mRNA 表达及 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达均无明显变化。

**2.4 bFGF 调节细胞周期** FCM 显示, 经 25  $\mu\text{g/L}$  bFGF 孵育 16 h 后, 与对照组相比 G1 期细胞减少 ( $0.65 \pm 0.01 \rightarrow 0.49 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ), S 期细胞增多 ( $0.14 \pm 0.01 \rightarrow 0.28 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), 但 wortmannin 能抑制此促增生作用 (G1:  $0.58 \pm 0.01$ ; S:  $0.22 \pm 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

大量研究表明, FGFS/FGFRS 信号传递与肿瘤发生发展的关系极为密切, 多种肿瘤细胞表达水平极高的 FGFR1 和 aFGF/bFGF, 以过量表达 FGFR1 和 aFGF/bFGF 为特征的自分泌信号环路是肿瘤细胞恶性增生的首要条件。研究肿瘤细胞信号传导机制, 选择性的阻断肿瘤细胞自分泌或旁分泌的信号传导通路, 破坏其自控性生长调节机制, 正在成为极具吸引力的研究热点<sup>[33]</sup>。p21<sup>WAF1</sup> 是最早发现并克隆的周期素依赖性激酶抑制剂, 对细胞内信号和细胞外信号均能作出反应, 参加细胞多种功能活动<sup>[30, 34]</sup>。p21<sup>WAF1</sup> 通过抑制 Cyclin-CDK 复合物活性, 充当协调细胞周期转换、检查点控制的内部定时机制, 而外部生长控制信号通过影响 p21<sup>WAF1</sup> 功能来控制细胞周期<sup>[31, 35]</sup>。bFGF 作用于 MCF-7 细胞, 既能增加 p21<sup>WAF1</sup> 的转录和表达并使 cdk2 失活及 Rb 去磷酸化, 降低 cyclin A 的表达, 同时又上调 G1 期蛋白如 cyclin D<sub>1</sub>、cyclin E 和 cdk4 的表达, 此双重作用的结果是抑制 MCF-7 细胞的增生。FGF 通过不依赖 MAPK 的途径活化 STAT1, 上调 p21<sup>WAF1</sup> 的 mRNA 水平和蛋白表达, 抑制 MCF-7 细胞增生<sup>[18]</sup>。FGF-2 处理 NIH3T3 细胞后, 通过非依赖 MAPK 途径诱导 p21<sup>WAF1</sup> 蛋白表达, 但 FGF-2 对 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 水平的上调作用部分依赖 MAPK 途径, 并且通过 MAPK 途径促进细胞进入 S 期<sup>[19]</sup>。我们采用外源性 bFGF 处理 Bel-7402 细胞, 结果表明 bFGF 能促进 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 水平升高, 导致 p21<sup>WAF1</sup> 的表达增加。PI3K 抑制剂 wortmannin 预处理的细胞, 经 bFGF 刺激后, 在各时间点 p21<sup>WAF1</sup> mRNA 水平无明显改变, 同时 p21<sup>WAF1</sup> 表达水平也无明显变化, 表明 bFGF 对 Bel-7402

p21<sup>WAF1</sup> 表达的影响是通过影响其转录活性实现的, 但是这种调节作用不依赖 PI3K/PKB 途径。FCM 检测细胞周期结果表明, bFGF 处理后细胞 G1 期比例下降, S 期比例增加, 这与 bFGF 促进细胞增生相符, 预先加入 PI3K 抑制剂 wortmannin 再用 bFGF 处理后, 这种促增生作用受到抑制 ( $P < 0.01$ ), 提示 bFGF 通过 PI3K/PKB 途径促进细胞周期进程, 使细胞从 G1 期  $\rightarrow$  S 期。可见, bFGF 对 p21<sup>WAF1</sup> 表达的诱导作用和对细胞周期进程的促进作用是通过不同途径实现的。已知 p21<sup>WAF1</sup> 是具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白, 可与几乎每一个 Cyclin-CDK 复合物结合。p21<sup>WAF1</sup> 抑制 Cyclin D-CDK4 和 Cyclin E-CDK2 的活性, 使 Rb 蛋白不能磷酸化, 从而使细胞周期停止在 G1 期。p21<sup>WAF1</sup> 通过与 Cyclin A-CDK2 结合间接抑制 DNA 合成<sup>[32-36]</sup>。本结果表明 bFGF 既能上调 p21<sup>WAF1</sup> 的表达, 同时又促进细胞进入 S 期, 这似乎是矛盾的。但是, 这两种作用是通过不同途径发生的。bFGF 能调节周期素和周期素依赖性激酶的表达<sup>[17]</sup>。因此, 我们可以初步推测如果 bFGF 诱导过量 Cyclin/CDK 的复合物形成, 超过了 p21<sup>WAF1</sup> 的结合能力, 细胞将从 G1 期  $\rightarrow$  S 期。

### 4 参考文献

- 1 Zimring MB, Thakker-Varia S. Increased fibroblast growth factor-like autoantibodies in serum from a subset of patients with cancer-associated hypercalcemia. *Life Sci* 2002; 71: 2939-2959
- 2 Keyes K, Cox K, Treadway P, Mann L, Shih C, Faul MM, Teicher BA. An in vitro tumor model: analysis of angiogenic factor expression after chemotherapy. *Cancer Res* 2002;62: 5597-5602
- 3 Hu M, Nicolson GL, Trent JC 2nd, Yu D, Zhang L, Lang A, Killary A, Ellis LM, Bucana CD, Pollock RE. Characterization of 11 human sarcoma cell strains: evaluation of cytogenetics, tumorigenicity, metastasis, and production of angiogenic factors. *Cancer* 2002;95:1569-1576
- 4 Joensuu H, Anttonen A, Eriksson M, Makitaro R, Alfthan H, Kinnula V, Leppä S. Soluble syndecan-1 and serum basic fibroblast growth factor are new prognostic factors in lung cancer. *Cancer Res* 2002;62:5210-5217
- 5 Coleman AB, Metz MZ, Donohue CA, Schwarz RE, Kane SE. Chemosensitization by fibroblast growth factor-2 is not dependent upon proliferation, S-phase accumulation, or p53 status. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1111-1123
- 6 Jeffers M, LaRochelle WJ, Lichtenstein HS. Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities. *Expert Opin Ther Targets* 2002;6:469-482
- 7 Adriaenssens E, Lemoine J, El Yazidi-Belkoura I, Hondermarck H. Growth signaling in breast cancer cells: outcomes and promises of proteomics. *Biochem Pharmacol* 2002;64:797-803
- 8 Dini G, Funghini S, Witort E, Magnelli L, Fanti E, Rifkin DB, Del Rosso M. Overexpression of the 18 kDa and 22/24 kDa FGF-2 isoforms results in differential drug resistance and amplification potential. *J Cell Physiol* 2002;193:64-72
- 9 Glenjen N, Mosevoll KA, Bruserud O. Serum levels of angiogenin, basic fibroblast growth factor and endostatin in patients receiving intensive chemotherapy for acute myelogenous leukemia. *Int J Cancer* 2002;101:86-94
- 10 Song Z, Wu X, Powell WC, Cardiff RD, Cohen MB, Tin RT, Matusik RJ, Miller GJ, Roy-Burman P. Fibroblast growth factor 8 isoform B overexpression in prostate epithelium: a new mouse model for prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res* 2002;62:5096-5105

- 11 Papanikolaou IS, Lazaris AC, Kavantzias N, Davaris PS. Minimal expression of the proto-oncogene int-2 encoded protein in a series of colorectal carcinomas. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:1084-1086
- 12 Pavlakovic H, Havers W, Schweigerer L. Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: implications for anti-angiogenic tumour therapy. *Angiogenesis* 2001;4:259-262
- 13 Berglund A, Molin D, Larsson A, Einarsson R, Glimelius B. Tumour markers as early predictors of response to chemotherapy in advanced colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1430-1437
- 14 Deniz ML, Kilic T, Almaata I, Kurtkaya O, Sav A, Pamir MN. Expression of growth factors and structural proteins in chordomas: basic fibroblast growth factor, transforming growth factor alpha, and fibronectin are correlated with recurrence. *Neurosurgery* 2002;51:753-760
- 15 Ngan ES, Ma ZQ, Chua SS, DeMayo FJ, Tsai SY. Inducible expression of FGF-3 in mouse mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11187-11192
- 16 Koh KR, Ohta K, Nakamae H, Hino M, Yamane T, Takubo T, Tatsumi N. Differential effects of fibroblast growth factor-4, epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 on functional development of stromal layers in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2002;26:933-938
- 17 Wang HS, Mark R, Eyal F, Anthony D, John M, Joachim Y, Robert W. Basic fibroblast growth factor causes growth arrest in MCF-7 human breast cancer cells while inducing both mitogenic and inhibitory G1 events. *Cancer Res* 1997;57:1750-1757
- 18 Johnson MR, Valentine C, Basilico C, Mansukhani A. FGF signaling activates STAT1 and p21 and inhibits the estrogen response and proliferation of MCF-7 cells. *Oncogene* 1998; 16:2647-2656
- 19 Kivinen L, Laiho M. Ras- and mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways in p21<sup>Cip1/Waf1</sup> induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. *Cell Growth Differ* 1999;10:621-628
- 20 Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Gu XM, Jiang LX, Sun XQ, Sheng ZY. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor  $\beta$  in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol* 2000;6:353-355
- 21 Al-Sakkaf KA, Mooney LM, Dobson PR, Brown BL. Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *J Endocrinol* 2000;167:85-92
- 22 Demoulin JP, Grasso L, Atkins JM, Stevens M, Louahed J, Levitt RC, Nicolaides NC, Renauld JC. Role of insulin receptor substrate-2 in interleukin-9-dependent proliferation. *FEBS Lett* 2000;482:200-204
- 23 Murao K, Ohyama T, Imachi H, Ishida T, Cao WM, Namihiro H, Sato M, Wong NC, Takahara J. TNF-alpha stimulation of MCP-1 expression is mediated by the Akt/PKB signal transduction pathway in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:791-796
- 24 Hixon ML, Muro-Cacho C, Wagner MW, Obejero-Paz C, Millie E, Fujio Y, Kureishi Y, Hassold T, Walsh K, Gualberto A. Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest* 2000; 106:1011-1120
- 25 Iynedjian PB, Roth RA, Fleischmann M, Gjinovci A. Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochem J* 2000;351:621-627
- 26 Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 2001;20:5991-6000
- 27 Ng SS, Tsao MS, Nicklee T, Hedley DW. Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2001;7:3269-3275
- 28 Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;107:80-88
- 29 Lorenzini A, Tresini M, Mawal-Dewan M, Frisoni L, Zhang H, Allen RG, Sell C, Cristofalo VJ. Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Exp Gerontol* 2002;37:1149-1156
- 30 Boulaire J, Fotedar A, Fotedar R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol* 2000;48:190-202
- 31 Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21(WAF1) regulation. *World J Gastroenterol* 2002;8:400-405
- 32 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
- 33 Yin F, Yao SK, Wu XM, Gao HS, Li ZH. Serapharmacological study of Ganzheng oral solution on proliferation and expression of ERK in SMMC-7721 cells with transforming growth factor  $\alpha$ . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1017-1020
- 34 Hu PZ, Zhang CS, Ma FC, Yang SJ, Wang WL. Expressions of cyclin-dependent kinase inhibitor P21<sup>WAF1/CIP1</sup> and PCNA in human hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:145-148
- 35 Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21<sup>WAF1</sup> gene expression with P53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- 36 Liu SL, Liu GZ, Cheng J, Shi DY, Chen HL, Zhang YD. Influence of PKB on ROS regulation of proliferation in human 7721 hepatoma cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2002;34: 67-72



# 经肝动脉注射 5-FU 白苾微球治疗兔 VX<sub>2</sub> 移植性肝癌

李 欣, 冯敢生, 郑传胜, 柳 曦, 孔 健

李欣, 冯敢生, 郑传胜, 柳曦, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022  
孔健, 深圳市人民医院放射科 广东省深圳市 518008  
李欣, 男, 1973-02-08 生, 湖北省武汉市人, 汉族. 2002 年于华中科技大学获博士学位, 主治医师. 主要从事影像诊断与介入治疗研究.  
国家自然科学基金资助项目, No. 39770839  
项目负责人: 冯敢生, 430022, 湖北省武汉市华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科. fgswh2001@yahoo.com.cn  
电话: 027-85726432 传真: 027-85776343  
收稿日期: 2002-01-09 接受日期: 2002-02-07

## Therapeutic efficacy of 5-FU bletilla striata microspheres infused through hepatic artery against rabbit VX<sub>2</sub> transplanted hepatoma

Xin Li, Gan-Sheng Feng, Chuan-Shen Zhen, Xi Liu, Jian Kong

Xin Li, Gan-Sheng Feng, Chuan-Shen Zhen, Xi Liu, Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan Hubei 430022, China  
Jian Kong, Department of Radiology, Shenzhen People's Hospital Shenzhen 518008, Guangdong Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39770839  
Correspondence to: Dr. Gan-Sheng, Feng Department of Radiology, Union Hospital, Wuhan 430022, Hubei Province China. fgswh2001@yahoo.com.cn  
Received: 2002-01-09 Accepted: 2002-02-07

## Abstract

**AIM:** To observe the therapeutic efficacy of 5-FU bletilla striata microspheres infused through hepatic artery against rabbit VX<sub>2</sub> transplanted hepatoma.

**METHODS:** Fifty rabbits bearing VX<sub>2</sub> transplanted hepatoma were randomly divided into five groups ( $n=10$ ). Normal saline 1 mL, 5-Fu solutions 1 mL, ultr-liquor-lipiodol 0.3-0.4 mL and 5-Fu solutions 1 mL, 100 g/L Bletillaolloid 0.4 mL and 5-Fu solutions 1 mL, 5 FU-bletilla striate microspheres 10 mg/kg were infused through hepatic artery respectively. The tumor growth rates, necrosis rates and hepatic function were compared among the 5 groups.

**RESULTS:** 5-FU bletilla striata microspheres had a very good vessel embolization function. In 5FU-bletilla striata microspheres group, the tumor was significantly inhibited, tumor growth rate was lower than tant in the control group ( $P<0.01$ ) and the lipiodol group ( $P<0.05$ ). Tumor necrosis grades were also more higher compared with to the other 4 groups. Complete necrosis was found in 2 of 10 rabbits in 5FU-bletilla striata microspheres group, which was more severe than that in the lipiodol group and bletillaolloid group. But the damage of normal liver tissues was also more serious.

**CONCLUSION:** 5-FU bletilla striata microsphere is a safe

and effective peripheral embolization agent.

Li X, Feng GS, Zhen CS, Liu X, Kong J. Therapeutic efficacy of 5-FU bletilla striata microspheres infused through hepatic artery against rabbit VX<sub>2</sub> transplanted hepatoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1337-1340

## 摘要

**目的:** 观察 5-FU 白苾微球经肝动脉注射对兔 VX<sub>2</sub> 移植性肝癌的治疗效果.

**方法:** 50 只兔 VX<sub>2</sub> 移植性肝癌模型, 随机分为 5 组 ( $n=10$ ), 采用直视下直接穿刺血管的方法, 分别经肝动脉注入生理盐水 1 mL; 5-FU 溶液 1 mL; 超液态碘油 0.3-0.4 mL 加 5-FU 溶液 1 mL; 100 g/L 白苾胶 0.4 mL 加 5-FU 溶液 1 mL; 5-FU 白苾微球 10 mg/kg 后, 观察肿瘤生长情况、坏死程度及肝功能变化等.

**结果:** 5-FU 白苾微球栓塞后肿瘤生长受到显著抑制, 肿瘤生长率低于对照组( $P<0.01$ )及碘油组( $P<0.05$ ). 肿瘤坏死以重度为主, 有 2 例完全坏死, 优于碘油组及白苾胶组. 但对正常肝组织损伤亦相对较重.

**结论:** 5-FU 白苾微球具有良好的血管栓塞作用, 使用方便、安全, 是一种理想的末梢性栓塞剂.

李欣, 冯敢生, 郑传胜, 柳曦, 孔健. 经肝动脉注射 5-FU 白苾微球治疗兔 VX<sub>2</sub> 移植性肝癌. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1337-1340  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1337.asp>

## 0 引言

介入化疗栓塞术是治疗肝癌最有效的方法之一<sup>[1-16]</sup>, 而栓塞剂及其剂型的选择是化疗栓塞治疗的研究重点<sup>[17-25]</sup>. 白苾是一种理想的栓塞剂<sup>[26-32]</sup>. 我们制备了 5-FU 白苾微球, 并用其对兔 VX<sub>2</sub> 移植性肝癌模型进行栓塞化疗研究, 以期阐明该微球对肝癌的疗效及作用机制, 为其在临床的合理应用提供可靠的理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ 新西兰大白兔 50 只, 重量 2-2.5 kg, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供; VX<sub>2</sub> 肿瘤细胞株由美国 ATCC 公司引进; 超液态碘油为法国 Aulnay-sous-Bios 公司产品, 5-FU 注射液为上海旭东海普药业有限公司产品. 白苾胶, 5-FU 白苾微球为我院药剂科制备, 制备方法及质量监控见文献 [30,31].

1.2 方法 兔VX<sub>2</sub>移植性肝癌模型的建立参照Prat (Hepatology 1995; 21: 832)的方法并加以改进<sup>[33]</sup>, 将瘤块接种于肝左外叶. 50只荷瘤兔, 随机分为5组, 每组10只, 即对照组: 经肝动脉灌注生理盐水1 mL; 5-FU组: 经肝动脉灌注5-FU溶液1 mL; 碘油+5-FU组: 经肝动脉灌注超液态碘油0.3-0.4 mL加5-FU溶液1 mL; 白芨胶+5-FU组: 经肝动脉灌注100 g/L白芨胶0.4 mL加5-FU溶液1 mL; 白芨微球组: 经肝动脉灌注5-FU白芨微球10 mg/kg. 于瘤块接种后14 d, 再次开腹, 将胃向左外完全翻出, 充分暴露肝门区后, 用自制27 G穿刺针直接穿刺肝固有或肝左动脉, 用动脉夹固定, 并暂时阻断肝右动脉血流. 造影及分别注射各组药物后, 对穿刺点局部加压止血, 逐层缝合、消毒, 动物分笼饲养. 术后1, 2, 3 wk进行CT及MR扫描, 依扫描所得瘤灶最大层面测定肿瘤的体积, 根据公式计算肿瘤生长率(growth rate, GR),  $GR = \frac{V_{\text{治疗前}}}{V_{\text{治疗后}}} \times 100\%$ . 术后2, 3 wk末各处死5只动物, 取肝组织, 以40 g/L多聚甲醛固定24 h, 石蜡包埋, 每份标本分2-3处取材, HE染色, 切片. 光镜下观察肿瘤组织坏死范围, 分为轻度(0-30%)、中度(30-70%)、重度(70-100%). 于术前、术后3, 7, 14, 21 d, 经耳缘静脉取血, 血样进行肝功能检查(TB、ALT). 由全自动血生化分析仪完成.

统计学处理 采用SPSS for Windows统计软件, 对成组资料进行方差分析、组间两两比较采用Newman-keuls检验, 对计数资料作 $\chi^2$ 检验, 均以 $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 组织病理学变化 5-FU白芨微球组, 栓塞后大体标本显示肝左叶可见斑片、片状局灶梗死灶, 呈苍白色, 界限清楚, 肿瘤切面可见中心明显坏死(图1). 光镜检查可见肿瘤明显凝固性坏死, 但大多数病例仍可见残余病灶, 及不同程度的出血、胆汁郁积. 瘤周可见较厚的纤维间隔, 其内可见较多炎性细胞浸润(图2). 正常肝组织亦见不同程度变性坏死, 其程度较碘油、白芨胶组栓塞组重, 肝内未见小脓肿形成. 5-FU白芨微球镜下呈半透明状, 多栓塞于小叶间动脉、微小动脉和毛细血管前微动脉水平, 栓塞血管彻底(图3). 变性、坏死区内的血管中微球多见. 被栓塞血管可出现(血管)炎性改变, 如血管壁增生、水肿, 局部有少量炎性细胞浸润, 常见继发性血栓形成, 并可见管腔闭塞. 肝窦、毛细血管、小静脉内及肺部标本未见栓塞. 但在栓塞区域门脉小分支内常可见血栓形成.

2.2 肿瘤生长和坏死 治疗前肿瘤体积差异均无显著性, 治疗后对照组兔肿瘤体积增大最明显, 5-FU白芨微球组兔肿瘤体积小于其余各组, 并有4例肿瘤体积缩小(表1). 对照组及5-FU组的肿瘤坏死程度以轻度坏死为主, 碘油组以中度为主, 兼有部分重度坏死, 白芨胶及白芨微球组则以重度坏死为主. 5-FU白芨微球组10例

中, 8例见肿瘤重度明显坏死, 其中2例完全坏死, 未见存活的癌细胞, 显著大于碘油栓塞组( $P < 0.05$ ). (表2)栓塞组术后ALT升高, 3 d达峰值, 然后逐渐下降, 2 wk左右降至正常, 总胆红素水平变化不明显.

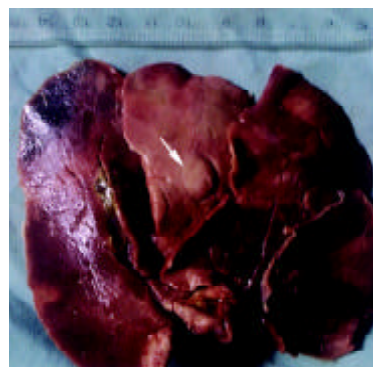


图1 栓塞后肝左叶片状局灶梗死灶, 箭头示肿瘤.

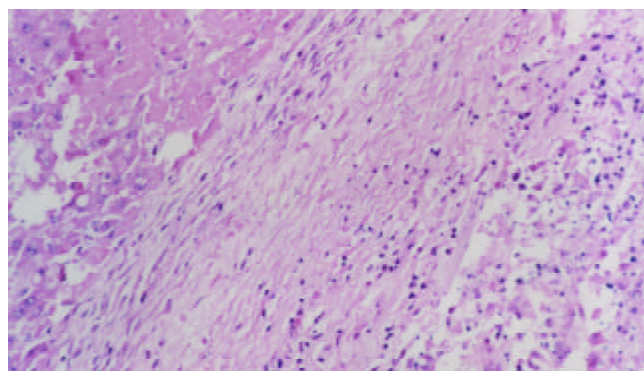


图2 5-FU白芨微球栓塞后肿瘤组织明显凝固性坏死, 瘤周可见较厚纤维间隔, 临近肝组织亦见变性坏死(HE染色 $\times 100$ ).

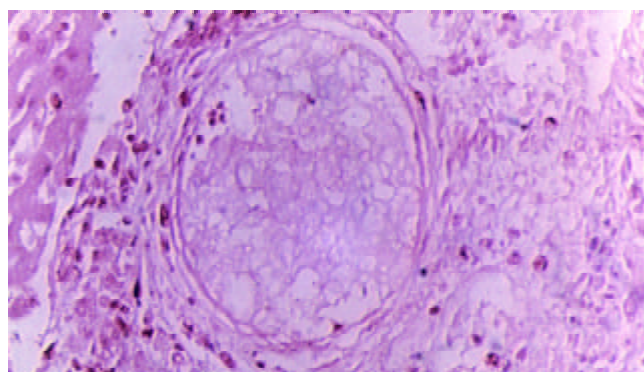


图3 5-FU白芨微球镜下呈半透明状, 栓塞于小叶间动脉内(HE染色 $\times 400$ ).

表1 兔移植性肝癌肿瘤体积及增长率( $\bar{x} \pm s$ )

分组	肿瘤体积( $\text{cm}^3$ )				术后3 wk 肿瘤增长率(倍)
	栓塞前	栓后1 wk	栓后2 wk	栓后3 wk	
对照组	$0.96 \pm 0.26$	$5.24 \pm 1.55$	$13.1 \pm 2.96$	$26.2 \pm 5.31$	$28 \pm 5.82$
5-FU化疗组	$0.99 \pm 0.49$	$5.22 \pm 1.96$	$11.9 \pm 2.16$	$23.1 \pm 4.76$	$25.72 \pm 8.28$
碘油+5-FU组	$0.99 \pm 0.39$	$1.95 \pm 0.27^a$	$3.00 \pm 1.18^a$	$6.66 \pm 1.98^a$	$6.99 \pm 1.94^a$
白芨胶+5-FU组	$1.00 \pm 0.31$	$1.43 \pm 0.29^a$	$2.14 \pm 0.88^a$	$4.20 \pm 1.76^a$	$4.27 \pm 0.99^a$
5-FU白芨微球组	$1.00 \pm 0.25$	$1.17 \pm 0.26^{ac}$	$1.72 \pm 1.24^a$	$2.84 \pm 1.69^{ac}$	$2.97 \pm 1.86^{ac}$

<sup>a</sup> $P < 0.01$ , vs 对照组, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , vs 碘油+5-FU组.

表 2 兔移植性肝癌肿瘤坏死程度

分组	轻度	中度	重度
对照组	10	0	0
5-FU 化疗组	9	1	0
碘油 +5-FU 组 <sup>a</sup>	2	6	2
白苕胶 +5-FU 组 <sup>a</sup>	0	3	7
5-FU 白苕微球组 <sup>ab</sup>	0	2	8

<sup>a</sup>P < 0.01, vs 对照组, <sup>b</sup>P < 0.05, vs 碘油 +5-FU 组.

### 3 讨论

中药白苕是一种集载体、栓塞、缓释及抗肿瘤作用为一体的较理想的栓塞剂<sup>[26-29]</sup>, 在白苕胶的基础上, 我们进一步制备了 5-FU 白苕微球, 并用其对兔 VX<sub>2</sub> 移植性肝癌模型进行栓塞化疗研究, 以判断其疗效及机制. 兔 VX<sub>2</sub> 肿瘤是一种常用的富血管性肿瘤<sup>[34-36]</sup>, 我们在国内外首次采用了直视下肝动脉直接穿刺法, 此法实验成功率高, 并可在栓塞的同时阻断肝右动脉, 达到了选择性栓塞的目的, 防止了误栓, 提高了术后动物的存活率. 结果显示, 5-FU 白苕微球在抑制肿瘤生长率方面显示了较好的疗效, 使肿瘤坏死更彻底, 有 4 例肿瘤缩小, 并有 2 例镜下可见肿瘤完全性坏死, 优于单纯化疗组及碘油栓塞组, 与白苕胶栓塞组相近并稍优. 但同时正常肝脏的损伤也相对较重, 大体肝标本可见斑片, 片状坏死区, 镜下可见正常肝组织变性严重, 并见点状、灶状坏死. 术后 ALT 有一过性升高, 但可较快恢复.

5-FU 白苕微球有良好的末梢栓塞作用, 5-FU 白苕微球粒径为 50-200 μm, 在栓塞后病理切片上显示其栓塞水平为肝动脉 3 级以下分支, 最远可达肝窦前动脉水平, 其层面在动-门脉间及肝内潜在吻合支水平以远<sup>[27, 28]</sup>, 减少了栓塞后侧支循环形成的可能性. 栓塞区域门脉末梢分支内常可见血栓形成, 推测微球本身及其分解产物可能通过动-门脉间吻合支进入门脉末梢<sup>[28, 29]</sup>, 起到了动-门脉双重栓塞的作用. 白苕有较强的促凝血作用, 5-FU 有较强的致血管炎作用, 可刺激血管产生血管炎、继发性栓塞, 加重了栓塞程度, 延长了栓塞时间. 白苕微球具有较好的载体和缓释作用, 可维持 5-FU 瘤内局部高浓度, 延长药物在肿瘤内的作用时间, 与栓塞起协同增效作用. 白苕本身有一定的抗肿瘤作用, 其主要成分黏液质是一种广谱抗肿瘤成分, 对肿瘤的发生、发展均有显著的抑制作用.

与造影剂混合后, 微球悬浮性和分散性好, 不粘结, 易经小管径导管注射, 易于操作, 使用方便. 而肝窦、毛细血管、小静脉内及肺部标本中未见微球栓塞作为栓塞剂, 说明 5-FU 白苕微球注射后能固定于靶器官内, 没有滤过毛细血管, 造成异位栓塞. 所有动物于栓塞后均生长良好. 这些结果均说明 5-FU 白苕微球具有

良好的生物相容性, 安全、可靠. 本研究表明, 5-FU 白苕微球具有良好的血管栓塞作用, 使用安全、方便, 是一种理想的末梢性栓塞剂, 但对正常肝组织的损伤也相对较重, 故在实际应用中应注意选择适当病例, 采用超选择性插管, 尽量避免损伤正常肝组织.

### 4 参考文献

- Zhang Z, Liu Q, He J, Yang J, Yang G, Wu M. The effect of preoperative transcatheter hepatic arterial chemoembolization on disease-free survival after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:2606-2612
- Sangro B, Herraiz M, Martinez-Gonzalez MA, Bilbao I, Herrero I, Belouqui O, Betes M, de-la-Pena A, Cienfuegos JA, Quiroga J, Prieto J. Prognosis of hepatocellular carcinoma in relation to treatment: A multivariate analysis of 178 patients from a single European institution. *Surgery* 1998;124:575-583
- Chia-Hsien Cheng J, Chuang VP, Cheng SH, Lin YM, Cheng TI, Yang PS, Jian JJ, You DL, Horng CF, Huang AT. Unresectable hepatocellular carcinoma treated with radiotherapy and/or chemoembolization. *Int J Cancer* 2001;96:243-252
- Fan J, Ten GJ, He SC, Guo JH, Yang DP, Wang GY. Arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:33-37
- O' Suilleabhain CB, Poon RT, Yong JL, Ooi GC, Tso WK, Fan ST. Factors predictive of 5-year survival after transarterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2003;90:325-331
- Ebied OM, Federle MP, Carr BI, Pealer KM, Li W, Amesur N, Zajko A. Evaluation of responses to chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;97:1042-1050
- Ramsey DE, Kernagis LY, Soulen MC, Geschwind JF. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:S211-221
- Lopez RR Jr, Pan SH, Hoffman AL, Ramirez C, Rojter SE, Ramos H, McMonigle M, Lois J. Comparison of transarterial chemoembolization in patients with unresectable, diffuse vs focal hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2002;137:653-657
- Lee JK, Chung YH, Song BC, Shin JW, Choi WB, Yang SH, Yoon HK, Sung KB, Lee YS, Suh DJ. Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:52-58
- Huang J, He X, Lin X, Zhang C, Li J. Effect of preoperative transcatheter arterial chemoembolization on tumor cell activity in hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:446-448
- Poyanli A, Rozanes I, Acunas B, Sencer S. Palliative treatment of hepatocellular carcinoma by chemoembolization. *Acta Radiol* 2001;42:602-607
- Acunas B, Rozanes I. Hepatocellular carcinoma: treatment with transcatheter arterial chemoembolization. *Eur J Radiol* 1999;32:86-89
- Rose DM, Chapman WC, Brockenbrough AT, Wright JK, Rose AT, Meranze S, Mazer M, Blair T, Blanke CD, Debelak JP, Pinson CW. Transcatheter arterial chemoembolization as primary treatment for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 1999;177:405-410
- 王成红, 赵化荣, 李俊. 消融配合肝动脉栓塞化疗治疗原发性肝癌. *世界华人消化杂志* 2002;10:858-859
- 罗运权, 王义, 陈汉, 吴孟超. 术前肝动脉化疗栓塞对可切除肝癌患者术后生存率的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:468-469
- 王红梅, 廖国清, 李虎城, 戴海峰, 解国清, 邹建军, 许红兵. 肝动脉灌注化疗 / 栓塞治疗中晚期肝癌 32 例. *世界华人消化杂志* 1999;7:684-686
- Kamada K, Nakanishi T, Kitamoto M, Aikata H, Kawakami

- Y, Ito K, Asahara T, Kajiyama G. Long-term prognosis of patients undergoing transcatheter arterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: comparison of cisplatin lipiodol suspension and doxorubicin hydrochloride emulsion. *J Vasc Interv Radiol* 2001;12:847-854
- 18 Chen MS, Li JQ, Zhang YQ, Lu LX, Zhang WZ, Yuan YF, Guo YP, Lin XJ, Li GH. High-dose iodized oil transcatheter arterial chemoembolization for patients with large hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:74-78
- 19 Ueno K, Miyazono N, Inoue H, Nishida H, Kanetsuki I, Nakajo M. Transcatheter arterial chemoembolization therapy using iodized oil for patients with unresectable hepatocellular carcinoma: evaluation of three kinds of regimens and analysis of prognostic factors. *Cancer* 2000;88:1574-1581
- 20 Kamada K, Kitamoto M, Aikata H, Kawakami Y, Kono H, Imamura M, Nakanishi T, Chayama K. Combination of transcatheter arterial chemoembolization using cisplatin-lipiodol suspension and percutaneous ethanol injection for treatment of advanced small hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2002;184:284-290
- 21 Koda M, Murawaki Y, Mitsuda A, Oyama K, Okamoto K, Idobe Y, Suou T, Kawasaki H. Combination therapy with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous ethanol injection compared with percutaneous ethanol injection alone for patients with small hepatocellular carcinoma: a randomized control study. *Cancer* 2001;92:1516-1524
- 22 Seki T, Tamai T, Nakagawa T, Imamura M, Nishimura A, Yamashiki N, Ikeda K, Inoue K. Combination therapy with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:1245-1251
- 23 Komemushi A, Tanigawa N, Okuda Y, Kojima H, Fujii H, Shomura Y, Sougawa M, Sawada S. A new liquid embolic material for liver tumors. *Acta Radiol* 2002;43:186-191
- 24 程剑华, 吴万垠, 刘伟胜, 常钢, 刘宇龙, 杨志刚, 李柳宁, 周红. 莪术油肝动脉灌注栓塞治疗原发性肝癌 17 例. *世界华人消化杂志* 1999;7:92
- 25 涂水平, 吴达明, 袁耀宗, 吴云林, 江石湖, 吴裕忻. 肝动脉灌注羟基喜树碱和栓塞治疗原发性肝癌. *世界华人消化杂志* 1999;7:158-160
- 26 Feng G, Kramann B, Zheng C, Zhou R. Comparative study on the long-term effect of permanent embolization of hepatic artery with Bletilla striata in patients with primary liver cancer. *J Tongji Med Univ* 1996;16:111-116
- 27 Zheng C, Feng G, Zhou R. New use of Bletilla striata as embolizing agent in the intervention treatment of hepatic carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1996;18:305-307
- 28 Zheng CS, Feng GS, Zhang YF. Bletilla colloid as a vascular embolization agent: experimental studies. *Chin J Radiol* 1998;32:188-191
- 29 Zheng C, Feng G, Liang H. Bletilla striata as a vascular embolizing agent in interventional treatment of primary hepatic carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 1998;111:1060-1063
- 30 Li WY, Du DM, Feng GS, Chen HT. Preparation of Bletilla striata microspheres and experimental study on embolization of hepatic artery in pigs. *Acta Univ Med Tongji* 1999;28:62-65
- 31 Li WY, Feng GS, Zheng CS, Zhen Y. Pharmacokinetics of 5-Fu Bletilla microspheres following renal arterial embolization in rabbits. *Acta Univ Med Tongji* 2001;30:501-502
- 32 Feng GS, Li X, Zheng CS, Zhou CK, Liu X, Wu HP. Mechanism of inhibition of tumor angiogenesis by Bletilla colloid: an experimental study. *Chin Med J* 2003;83:412-416
- 33 Prat F, Centarti M, Sibille A, Abouel-Fadil FA, Henry L, Chapelon JY, Cathignol D. Extracorporeal high-intensity focused ultrasound for VX2 liver tumors in the rabbit. *Hepatology* 1995;21:832-836
- 34 Boehm T, Malich A, Goldberg SN, Reichenbach JR, Hilger I, Hauff P, Reinhardt M, Fleck M, Kaiser WA. Radio-frequency tumor ablation: internally cooled electrode versus saline-enhanced technique in an aggressive rabbit tumor model. *Radiology* 2002;222:805-813
- 35 Tabaru K, Konno T, Oda T, Nagamitsu A, Ishimaru Y, Kitamura N. Treatment of VX2 carcinoma implanted in the liver with arterial and intraperitoneal administration of oily anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:149-154
- 36 Hamuro M, Nakamura K, Sakai Y, Nakata M, Ichikawa H, Fukumori Y, Yamada R. New oily agents for targeting chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1999;22:130-134



# KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响

司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平

司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心 重庆市 400038  
司遂海, 男, 1966-10-26 生, 河南新郑人, 汉族, 1989 年第三军医大学本科学历, 2000 年第三军医大学消化系病学硕士研究生。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30070348  
项目负责人: 杨建民, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心. jianminyang@hotmail.com  
电话: 023-68754678 传真: 023-68754124  
收稿日期: 2002-07-31 接受日期: 2002-08-16

## Effects of KAI1 gene on KAI1 protein expression in MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells with high metastatic potential

Sui-Hai Si, Jian-Min Yang, Yuan-Hui Luo, Dian-Chun Fang, Ping Zhou

Sui-Hai Si, Jian-Min Yang, Yuan-Hui Luo, Dian-Chun Fang, Ping Zhou, Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30070348  
Correspondence to: Jian-Min Yang, Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. jianminyang@hotmail.com  
Received: 2002-07-31 Accepted: 2002-08-16

## Abstract

**AIM:** To construct sense and antisense KAI1 expression plasmids and to explore their effects on KAI1 protein expression in MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells with high metastatic potential.

**METHODS:** Sense and antisense KAI1 expression plasmids were constructed using subclone technique and transfected into MHCC97-H cells by DOTAP liposome system. KAI1 protein expression in transfected MHCC97-H cells was analyzed with immunocytochemical SP method.

**RESULTS:** Analysis of restriction endonuclease indicated the structure of two recombinants was consistent with the expected results of sense and antisense KAI1 expression plasmids. Compared with MHCC97-H cells, KAI1 protein staining in the MHCC97-H-S cells transfected with sense KAI1 expression plasmid was obviously enhanced (Integra Oculus Dehter, IOD  $20.127 \pm 5.099$  vs  $12.675 \pm 1.921$ ,  $P < 0.05$ ). However, KAI1 expression in the MHCC97-H-AS cells transfected with KAI1 antisense gene was obviously weakened (IOD  $8.681 \pm 2.472$  vs  $12.675 \pm 1.921$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** We successfully constructed sense and antisense KAI1 expression plasmids. Sense KAI1 gene can upregulate the expression of KAI1 protein in MHCC97-H

cells. On the other hand, antisense KAI1 gene can downregulate the expression of KAI1 protein in MHCC97-H cells.

Si SH, Yang JM, Luo YH, Fang DC, Zhou P. Effects of KAI1 gene on KAI1 protein expression in MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells with high metastatic potential. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1341-1344

## 摘要

**目的:** 构建 KAI1 基因正、反义真核表达质粒, 了解其对高转移潜能的 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响。

**方法:** 利用亚克隆技术构建 KAI1 基因正、反义真核表达质粒, 并用脂质体法将其分别转入高转移潜能的 MHCC97-H 肝癌细胞系, 通过免疫细胞化学 SP 法检测 KAI1 蛋白表达情况。

**结果:** 限制性内切酶分析证明两个重组子的结构均与 KAI1 正、反义基因表达质粒的预期结构一致。免疫细胞化学 SP 法检测显示, 转入正义 KAI1 基因后的肝癌细胞 KAI1 蛋白染色加深, (细胞积分光密度 integra oculus dehter, IOD  $20.127 \pm 5.099$  vs  $12.675 \pm 1.921$ ,  $P < 0.01$ ); 而转入反义 KAI1 基因的肝癌细胞则 KAI1 蛋白染色变浅, (IOD  $8.681 \pm 2.472$  vs  $12.675 \pm 1.921$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 成功构建了 KAI1 基因正、反义真核表达质粒。KAI1 正义基因能上调肝癌细胞 KAI1 蛋白的表达, 相反, KAI1 反义基因则能下调肝癌细胞 KAI1 蛋白的表达。

司遂海, 杨建民, 罗元辉, 房殿春, 周平. KAI1 正反义基因对 MHCC97-H 肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1341-1344  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1341.asp>

## 0 引言

肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-7]</sup>, 在诊断时多已发生肝内或远处转移, 部分患者虽可进行手术切除, 但术后复发率高<sup>[8-16]</sup>. 因此, 转移与复发是影响肝癌预后的最主要因素<sup>[17]</sup>. KAI1 基因是近年来发现的一种新的肿瘤转移抑制基因, 国外已在前列腺癌等肿瘤的研究中得到证实<sup>[18]</sup>, 但 KAI1 基因在肝癌转移中的作用尚不清楚. 我们利用亚克隆技术构建了正、反义 KAI1 基因真核表达质粒, 并将其分别转染入具有高转移潜能的肝癌细胞系 MHCC97-H, 以免疫细胞化学 SP 法观察其对肝癌细胞 KAI1 蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** pCMV-KAI1表达质粒由美国国立卫生研究院(NIH) Barrett教授和Dong博士惠赠, 其中1.6 kb的KAI1 cDNA经XhoI I位点插入pCMV-neo, 构成重组质粒pCMV-KAI1; 真核表达质粒载体pCI-neo为Promega公司产品, 大肠杆菌株DH5  $\alpha$  由本室周平博士惠赠; 各种限制性内切酶、小牛肠碱性磷酸酶、T4 DNA连接酶均为New England Biolabs公司产品; 凝胶提取试剂盒、快速质粒提取盒为Promega公司产品; 转染用脂质体DOTAP为Roche公司产品; 筛选用G418抗生素为Pierce公司产品. 培养细胞用高糖DMEM培养基和胎牛血清为Hyclone公司产品; 免疫细胞化学SP试剂盒及DAB染色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品. KAI1兔抗人单克隆抗体为Santa Cruz公司产品; MHCC97-H是一种高转移潜能的肝细胞癌细胞系<sup>[19]</sup>, 购自上海复旦大学医学院中山医院肝癌研究所. 转染前后均以高糖DMEM培养基(加100 ml/L胎牛血清、青霉素100 kU/L、链霉素100 kU/L)在37  $^{\circ}\text{C}$ , 50 ml/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下培养.

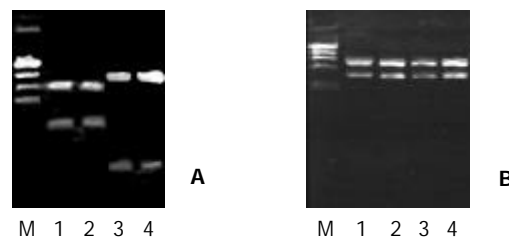
**1.2 方法** KAI1基因正、反义真核表达质粒的亚克隆重组及鉴定. 经分析物理图谱以XbaI将pCMV-KAI1表达质粒(全长8.2 kb)及真核表达载体质粒pCI-neo(全长5.47 kb)酶切, 电泳证实酶切完全后, 用凝胶提取试剂盒提取来自pCMV-KAI1表达质粒、含KAI1 cDNA的3 kb目的片段和线性化的pCI-neo. 为防止线性化载体的粘性末端发生自身环化或串联, 以小牛肠碱性磷酸酶(CIP)将线性化的真核表达载体质粒pCI-neo 5'端去磷酸化, 然后用T4 DNA连接酶将目的片段与线性化质粒载体连接. 连接产物转化DH5  $\alpha$  制备的感受态细菌, 铺板经氨苄青霉素筛选菌落, 扩增后以快速质粒提取盒提取质粒, 进而酶切鉴定. 基因转染及细胞的筛选. MHCC97-H细胞在6孔培养板中, 用含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM, 在37  $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下培养至细胞60-80%汇合. 采用DOTAP脂质体介导基因转染的方法(按产品说明书操作). 准备溶液A: 于100  $\mu\text{L}$ 无血清DMEM细胞培养液中加入6  $\mu\text{g}$ 质粒. 准备溶液B: 于85  $\mu\text{L}$ 无血清高糖DMEM细胞培养液中加入15  $\mu\text{L}$ 脂质体, 轻轻混匀A、B液, 室温放置15 min, 补足1 mL无血清高糖DMEM, 加在用无血清高糖DMEM培养液洗过两次的细胞单层上, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养8 h. 换用含100 mL/L胎牛血清的高糖DMEM培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养48 h, 按1:4传代, 加含1 000 mg/L G418的培养基进行筛选, 直到筛选出阳性克隆. 混合所有阳性克隆, 再扩增培养, G418以250-300 mg/L维持. 设立空载体pCI-neo转染作为对照. 免疫细胞化学分析. 采用免疫细胞化学SP法, 操作过程依说明书进行. 阴性对照以PBS代替一抗, 苏木素染色前以TIGER-920图像仪(V3.3)进行图像分析.

统计学处理 采用SPSS(V10.0)统计程序包进行分

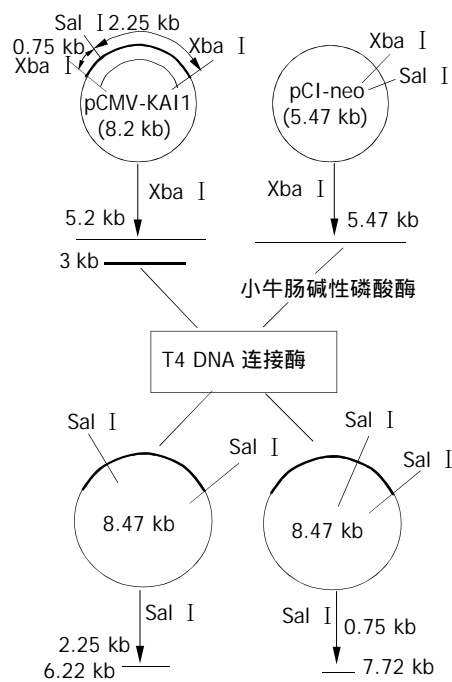
析,  $P < 0.05$  为差异显著,  $P < 0.01$  为差异非常显著,  $P > 0.05$  为差异不显著.

## 2 结果

**2.1 KAI1正反义真核表达重组质粒构建及鉴定** 因pCMV-KAI1质粒与真核表达载体质粒pCI-neo均系采用XbaI酶切, 因此, 重组后目的片段就有正、反两个方向插入的可能. 为证实并区分重组的正、反义真核表达质粒, 选取目的片段中一个偏离中心位置的Sal I酶切位点及pCI-neo本身的一个Sal I位点, 用Sal I酶切重组子, 分别得到预测的正义重组质粒的2.25 kb, 6.22 kb两个片段及反义重组质粒的0.75 kb, 7.72 kb两个片段(图1A). 为进一步证实目的片段已插入载体, 再用XbaI酶切所获得的两个重组子, 均又重新获得3 kb及5.4 kb片段(图1B), 证明已获得KAI1正、反义真核表达质粒两个重组子, 分别命名为pCI-KAI1及pCI-anti-KAI1. KAI1基因正反义真核表达质粒构建流程如图2所示.



M:  $\lambda$  DNA/Hind III Marker (23.13 kb, 9.42 kb, 6.56 kb, 4.36 kb, 2.32 kb, 2.02 kb) 1, 2: pCI-KAI1 3, 4: pCI-anti-KAI1.  
图1 正反义重组质粒的Sal I和Xba I酶切图.



KAI1基因正义真核表达质粒 KAI1基因反义真核表达质粒

图2 KAI1基因正反义真核表达质粒的构建流程图.

**2.2 免疫细胞化学分析** 转染pCI-KAI1的肝癌细胞命名为MHCC97-H-S, 转染pCI-anti-KAI1的肝癌细胞命

名为 MHCC97-H-AS. 免疫细胞化学 SP 法检测显示 MHCC97-H-S 细胞 KAI1 蛋白染色较 MHCC97-H 细胞深, IOD 为  $20.127 \pm 5.099$ , MHCC97-H 细胞为  $12.675 \pm 1.921$ (均为苏木素染色前测定), 二者有明显区别( $P < 0.05$ ); 而 MHCC97-H-AS 细胞 KAI1 蛋白染色较 MHCC97-H 细胞浅, IOD 为  $8.681 \pm 2.472$ , 与 MHCC97-H 细胞有明显区别( $P < 0.05$ ). 苏木素染色后的图像见(图3 A-C). 转染空载体 pCI-neo 后细胞 KAI1 蛋白染色情况与 MHCC97-H 细胞则无明显差别.

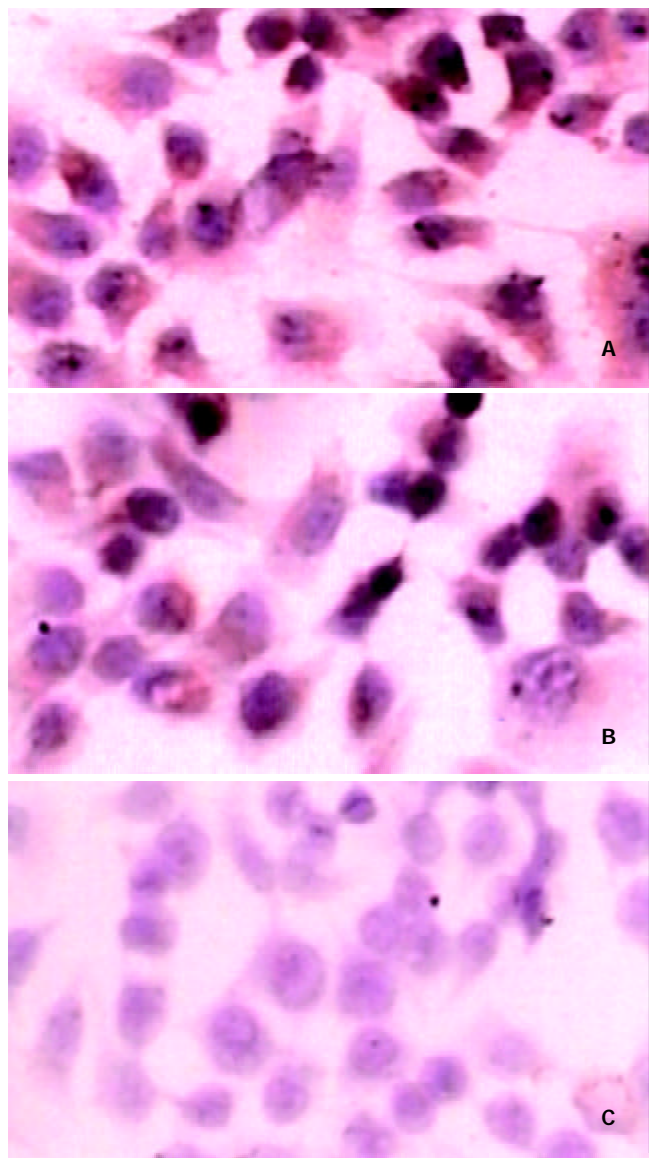


图3 免疫组化 SP 染色结果(SP × 400).  
A MHCC97-H-S 细胞.  
B MHCC97-H 细胞.  
C MHCC97-H-AS 细胞.

### 3 讨论

流行病学的研究资料表明, 近年来我国肝细胞癌的发病率有明显增加趋势. 但有关肝细胞癌的发病机制, 目前仍不完全清楚. 分子生物学方面的研究显示癌基因异常表达与抑癌基因异常失活是癌细胞无限增生的重要原因<sup>[20-24]</sup>. 肿瘤不仅在原发灶通过肿瘤血管从宿主获得

营养, 而且向宿主输出大量恶性细胞, 导致肿瘤不断生长和转移<sup>[25-28]</sup>. 因此, 肿瘤的转移和复发机制及其防治研究已成为当今肿瘤研究的重点方向之一.

KAI1 基因是 Dong et al<sup>[18]</sup> 于 1995 年首先在前列腺癌细胞中克隆出的一种肿瘤转移抑制基因. 该基因位于人类染色体 11p11.2, 编码产物为含 267 个氨基酸的细胞膜糖蛋白,  $M_r$  29 600 道尔顿. 进一步的研究显示, KAI1 不仅在前列腺癌细胞表达下调, 而且在食管癌<sup>[29]</sup>、胃癌<sup>[30]</sup>、肝癌<sup>[31]</sup>、胰腺癌<sup>[32,33]</sup>、结直肠癌<sup>[34]</sup>等多种消化系统转移性肿瘤中表达下调. 其分子结构中有 4 个疏水区 and 1 个含有 3 个潜在 N-糖基化位点的细胞外亲水区, 因而属跨膜 4 超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)成员. 因他们均系细胞膜糖蛋白, 作用于细胞-细胞或细胞-细胞间基质之间, 故推测其可能介导细胞间及细胞与间质之间的黏附, 因而其表达的下调可能参与肿瘤细胞的转移. 目前, 有关 KAI1 基因与肝细胞癌关系的研究文献报道很少. Sun et al 用 RT-PCR 法研究了 42 例肝癌标本, 发现 57.1% 的肿瘤组织中 KAI1 表达呈阳性. 其表达率与肝癌大小、有无包膜及 AFP 是否阳性无关, 但有肝内转移者比无肝内转移者表达率明显下降<sup>[31]</sup>. Guo et al 用 Northern blot 及原位杂交技术研究也有类似的发现<sup>[34]</sup>. 这些研究结果提示 KAI1 基因可能在肝癌细胞侵袭及转移中起着重要作用.

虽然有关 KAI1 基因与人类肿瘤转移抑制关系的研究已有不少报道, 但大多是从临床病理学的角度进行, 目前 KAI1 基因在肝癌转移中作用及其机制仍不清楚. 在本实验中, 通过亚克隆重组技术, 并经酶切证实, 成功构建了 KAI1 基因的正、反义真核表达质粒, 并应用脂质体 DOTAP 转染技术将其分别转入具有高转移潜能的肝癌细胞系 MHCC97-H 中. 结果显示转入正义 KAI1 基因后肝癌细胞中 KAI1 蛋白表达上调, 相反, 转入 KAI1 反义基因后则 KAI1 蛋白表达下调. 说明 KAI1 正、反义基因转染可影响肝癌细胞 KAI1 蛋白的表达. 这种基因转染对高转移潜能 MHCC91-H 肝癌细胞系的生长、侵袭、转移的影响及其机制的研究, 我们正在进行之中.

### 4 参考文献

- 1 Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- 2 Zhang J, Liu YF, Yang SJ, Sun ZW, Qiao Q, Zhang SZ. Construction and expression of mouse/humanized scFv and their fusion to humanized mutant TNF  $\alpha$  against hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:616-620
- 3 Wang JP, Duan GR, Zhao YL, Du DW. Effect of p16 gene expression in growth of human hepatic carcinoma cell line 7721 with confocal microscopic analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:767-770
- 4 Shao XD, Wu KC, Guo XZ, Xu JH, Guo CC, Meng FP, Fan DM. Studies on expression of KAI1 gene in tissue of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1238-1241
- 5 Liang Y, Lu B, Cui ZF, Li XD, Guo YJ, Liu YJ. The expression

- of Fas/FasL in hepatocellular carcinomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1364-1368
- 6 Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang SZ. Construction and expression of anti-HCC immunotoxin of sFv-TNF- $\alpha$  and GFP fusion proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:640-644
  - 7 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1139-1142
  - 8 Tang ZY, Sun FX, Tian J, Ye SL, Liu YK, Liu KD, Xue Q, Chen J, Xia JL, Qin LX, Sun HC, Wang L, Zhou J, Li Y, Ma ZC, Zhou XD, Wu ZQ, Lin ZY, Yang BH. Metastatic human hepatocellular carcinoma models in nude mice and cell line with metastatic potential. *World J Gastroenterol* 2001;7:597-601
  - 9 Ikeda M, Okada S, Ueno H, Okusaka T, Kuriyama H. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with multiple lung metastases: a case report. *Jpn J Clin Oncol* 2001;31:454-458
  - 10 Wang ZX, Hu GF, Wang HY, Wu MC. Expression of liver cancer associated gene HCCA3. *World J Gastroenterol* 2001;7:821-825
  - 11 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
  - 12 Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal  $\beta$ -catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001;7:542-546
  - 13 Huang XF, Wang CM, Dai XW, Li ZJ, Pan BR, Yu LB, Qian B, Fang L. Expressions of chromogranin A and cathepsin D in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:693-698
  - 14 Parks RW, Garden OJ. Liver resection for cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:766-771
  - 15 Xu HY, Yang YL, Guan XL, Song G, Jiang AM, Shi LJ. Expression of regulating apoptosis gene and apoptosis index in primary liver cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:721-724
  - 16 Lin NF, Tang J, Mohamed Ismael HS. Study on environmental etiology of high incidence areas of liver cancer in China. *World J Gastroenterol* 2000;6:572-576
  - 17 陈孝平, 吴在德, 裘法祖. 加强基础研究, 提高原发性肝癌的外科治疗效果. *中华实验外科杂志* 2000;5:393-394
  - 18 Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* 1995;268:884-886
  - 19 Li Y, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Chen J, Xue Q, Gao DM, Bao WH. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97. *World J Gastroenterol* 2001;7:630-636
  - 20 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of hepatitis C virus infection on expression of several cancer-associated gene products in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:25-27
  - 21 Qin LL, Su JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yian RQ. Expression of IGF-II, p53, P21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in tree shrews. *World J Gastroenterol* 2000;6:138-139
  - 22 Lin GY, Chen ZL, Lu CM, Li Y, Ping XJ, Huang R. Immunohistochemical study on p53, H-rasp21, c-erbB-2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and minority ethnic patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:234-238
  - 23 Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to P21<sup>WAF1</sup> expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol* 2000;6:356-360
  - 24 Roberts LR, LaRusso NF. Potential roles of tumor suppressor genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinogenesis in southern African blacks. *World J Gastroenterol* 2000;6:37-41
  - 25 Guo XZ, Friess H, Shao XD, Liu MP, Xia YT, Xu JH, Buchler MW. KAI1 gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer: influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000;6:866-871
  - 26 Jiang BJ, Sun RX, Lin H, Gao YF. Study on the risk factors of lymphatic metastasis and the indications of less invasive operations in early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6:553-556
  - 27 Furger KA, Menon RK, Tuckl AB, Bramwelll VH, Chambers AF. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* 2001;1:621-632
  - 28 Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* 2002;84:57-80
  - 29 Uchida S, Shimada Y, Watanabe G, Li ZG, Hong T, Miyake M, Imamura M. Motility-related protein (MRP-1/CD9) and KAI1/CD82 expression inversely correlate with lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;79:1168-1173
  - 30 Hinoda Y, Adachi Y, Takaoka A, Mitsuuchi H, Satoh Y, Itoh F, Kondoh Y, Imai K. Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett* 1998;129:229-234
  - 31 Sun HC, Tang ZY, Zhou G, Li XM. KAI1 gene expression in hepatocellular carcinoma and its relationship with intrahepatic metastases. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17:307-311
  - 32 Friess H, Guo XZ, Tempia-Caliera AA, Fukuda A, Martignoni ME, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW. Differential expression of metastasis-associated genes in papilla of Vater and pancreatic cancer correlates with disease stage. *J Clin Oncol* 2001;19:2422-2432
  - 33 Lombardi DP, Geradts J, Foley JF, Chiao C, Lamb PW, Barrett JC. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res* 1999;59:5724-5731
  - 34 Guo XZ, Friess H, Di Mola FF, Heinicke JM, Abou-Shady M, Graber HU, Baer HU, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW. KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;28:1481-1488



# 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化

赵海磊, 刘 成, 赵爱光

赵海磊, 赵爱光, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科 上海市 200032  
刘成, 上海中医药大学肝病研究所 上海市 200032  
赵海磊, 男, 1972-10-11 生, 上海市人, 汉族. 2002 年上海中医药大学博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事中西医结合防治消化道肿瘤的临床与实验研究工作.

上海市青年科技启明星计划, No. 02QB14043

上海市教委基金资助课题, No. 01C06

项目负责人: 赵爱光, 200032, 上海市宛平南路 725 号, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤一科. aiguangzhao@hotmail.com

电话: 021-64385700-2104

收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

## Differentiation of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell line induced by Chinese medicine recipe Weichangan

Hai-Lei Zhao, Cheng Liu, Ai-Guang Zhao

Hai-Lei Zhao, Ai-Guang Zhao, No.1 Oncology Department of Longhua Hospital, affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Cheng Liu, Institute of Liver Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by Research Grant of Shanghai Youth Science and Technology Venus Program, No. 02QB14043, Shanghai Education Committee Grant, No. 01C06

Correspondence to: Dr. Ai-Guang Zhao, No.1 Oncology Department of Longhua Hospital, affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. aiguangzhao@hotmail.com

Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-28

## Abstract

**AIM:** To observe the differentiation in hepatocellular carcinoma cell line induced by Chinese medicine recipe Weichangan.

**METHODS:** Weichangan, contrasted by the retinoic acid and distilled water, was made by using serum pharmacological method. The inhibition on the growth of SMMC-7721 cell line by Weichangan was observed through the method of MTT and Alamar Blue. Radioimmunoassay was applied to determine the concentration of  $\alpha$ -fetoprotein and albumin secreted by the incubated cells. Western blot method was used to detect the mutant p53, p16 and p21 protein expression in SMMC-7721 cell line.

**RESULTS:** MTT assay showed both Weichangan and serum retinoic acid had inhibiting effect on the proliferation of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell line. Weichangan reached its maximal inhibition effect after 48 hours, while the effect of retinoic acid decreased gradually after 48 hours. Alamar Blue method showed that significant decrease was found in serum Weichangan after 16 hours compared with that in the control. After 32 hours, the decrease induced by Alamar Blue was more significant than that in cells incubated with serum Weichangan compared with those incubated in serum retinoic acid, indicating the gradual and durable action of Weichangan recipe. The decreased

amount ( $11.4 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$  vs  $17.2 \pm 1.1 \mu\text{g/L}$ ,  $P = 0.036$ ) of  $\alpha$ -fetoprotein and increased amount ( $0.40 \pm 0.02 \text{ mg/L}$  vs  $0.29 \pm 0.01 \text{ mg/L}$ ,  $P = 0.043$ ) of albumin were found in the cells incubated in serum Weichangan. Western blot method showed decreased expression of p53 protein and increased expression of p16 and p21 protein in cells incubated in serum Weichangan.

**CONCLUSION:** The results suggest that Weichangan inhibits the growth of SMMC-7721 cell line and induces the differentiation in this hepatocellular carcinoma cell line. The effect on p53, p16 and p21 may be the mechanisms of Weichangan in inducing the differentiation of this cell lines.

Zhao HL, Liu C, Zhao AG. Differentiation of hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell line induced by Chinese medicine recipe Weichangan. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1345-1348

## 摘要

**目的:** 观察中药复方胃肠安诱导肝癌细胞分化的作用.

**方法:** 以 SMMC-7721 人肝癌细胞为研究对象, 维甲酸为对照, 采用药物血清添加法, 通过 MTT 法和 Alamar Blue 法观察胃肠安对肝癌细胞增生的抑制作用; 放射免疫法观察对肝癌细胞分泌甲胎蛋白和白蛋白的影响; Western blot 观察对肝癌细胞 P53、P16 以及 P21 蛋白表达的影响.

**结果:** MTT 法显示胃肠安与维甲酸对 SMMC-7721 人肝癌细胞增生均有抑制作用, 胃肠安在 48 h 达到最大, 而维甲酸对细胞增生的抑制作用在 48 h 后逐渐下降, 较胃肠安组明显降低. Alamar Blue 法结果显示, 16 h 后, 胃肠安组细胞还原的 Alamar Blue 值较对照组明显减少, 并在 32 h 后较维甲酸组显著下降, 提示与维甲酸相比, 胃肠安作用起效慢但持续时间长; 胃肠安组分泌的甲胎蛋白较对照组显著减少 ( $11.4 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$  vs  $17.2 \pm 1.1 \mu\text{g/L}$ ,  $P = 0.036$ ), 而白蛋白显著增多 ( $0.40 \pm 0.02 \text{ mg/L}$  vs  $0.29 \pm 0.01 \text{ mg/L}$ ,  $P = 0.043$ ); 胃肠安组突变型 P53 蛋白的表达较对照组明显减少, 而 P16 蛋白和 P21 蛋白的表达较对照组增多.

**结论:** 胃肠安方剂具有抑制 SMMC-7721 人肝癌细胞增生、诱导细胞分化的作用, 其机制可能在于减少突变型 P53 蛋白表达和增加 P16, P21 蛋白表达.

赵海磊, 刘成, 赵爱光. 中药复方胃肠安血清诱导肝癌 SMMC-7721 细胞分化. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1345-1348

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1345.asp>

## 0 引言

癌症是分化异常的疾病<sup>[1-3]</sup>, 分化障碍可能决定了肿瘤

细胞的恶性程度<sup>[4,5]</sup>,因此诱导分化已成为肿瘤治疗学研究的热点<sup>[6,7]</sup>.中药复方胃肠安以健脾扶正中药为主,临床与实验研究证实对包括肝癌在内的消化道肿瘤有良好的防治效果.我们重点研究胃肠安方剂防治肝癌的机制是否在于诱导肝癌细胞分化.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选用人肝癌细胞株 SMMC-7721,购自中国科学院细胞生物研究所. Wistar大鼠,质量  $250 \pm 30$  g,普通级,常规颗粒饲料喂养,由上海中医药大学实验动物中心提供,制备药物血清用. 胃肠安(太子参 12 g、炒白术 12 g、茯苓 30 g、姜半夏 9 g、红藤 30 g、野葡萄藤 30 g、藤梨根 30 g、陈皮 4.5 g、生牡蛎 30 g、夏枯草 9 g、绿萼梅 9 g、青皮 4.5 g),配制成 100 g/L 的灌胃液. 全反式维甲酸由瑞金医院血液研究所提供,配制成 0.5 g/L 的灌胃液. RPMI1640 培养基干粉和胎牛血清(FBS),Gibco 公司产品;噻唑蓝 (MTT)购自华美生物制品有限公司;Alamar Blue: Nalgene Biosource 公司产品;甲胎蛋白与白蛋白放免分析药盒,上海生物制品研究所产品;兔抗 P53 多克隆抗体,博士德生物科技有限公司产品; p21<sup>WAF1</sup>/Cip1/Sdi1/Pic1 鼠单克隆抗体、p16<sup>INK4a</sup>/MTS1 鼠单克隆抗体, Antibody Diagnostica Inc. 产品;抗鼠 Ig、抗兔 Ig, Amersham Pharmacia Biotech 公司产品.

**1.2 方法** SMMC-7721 细胞以含 100 mL/L FBS 的 RPMI1640 培养液, 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养 96 h. 细胞传代以 2.5 g/L Trypsin-EDTA 消化细胞后, 加入 FBS 中止消化. 药物血清制备按参考文献[8]进行. 大鼠分别以 20 mL/kg 灌以胃肠安灌胃液与维甲酸灌胃液(均相当于临床成人用量的 10 倍), 对照组灌以等量生理盐水, 共 3 d, 2 次/d, 2 次灌胃间隔 6 h. 第 3 d 灌胃结束后禁食, 次日晨再灌胃 1 次. 1 h 后下腔静脉取血. 每只大鼠取 5-8 mL 静脉血, 离心分离血清, 即为胃肠安药物血清、维甲酸药物血清和对照血清. 56 °C 水浴灭活 30 min 后分装, 置低温冰箱中备用. 随机分为胃肠安组、维甲酸组、对照组, 分别添加 9:1 的 RPMI1640/ 胃肠安药物血清、RPMI1640/ 维甲酸药物血清、RPMI1640/ 对照血清, 使配制的各组细胞温育液中药血清浓度为 100 mL/L.

**1.2.1 SMMC-7721 细胞增生检测** 采用 MTT 法<sup>[9]</sup>: 各孔加入细胞温育液 100  $\mu$ L 培养 12, 24, 48, 72, 96 h 观察药物血清对细胞增生的抑制作用. Alamar Blue 法<sup>[10]</sup>. SMMC-7721 细胞以  $5.0 \times 10^3$ /孔加入 96 孔板. 细胞贴壁后加入各组细胞温育液和 Alamar Blue, Alamar Blue 在总体积中浓度为 100 mL/L. 培养 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 72 h 后酶标仪 570 nm 和 590 nm 分别测 A 值, 计算 AB 值.

**1.2.2 甲胎蛋白及白蛋白含量的测定** SMMC-7721 细胞以  $2.5 \times 10^8$ /L 种于培养瓶中. 细胞贴壁后分别加入各组细胞温育液 2 mL. 48 h 后吸弃上清, 加入 RPMI1640 培养液 2 mL 培养 48 h. 吸取上清液于离心管中, 1 000 g,

离心 5 min. 取上清 1.5 mL 冷冻干燥. 采用放免法测定.

**1.2.3 P53, P16 和 P21 蛋白的表达** 采用 Western blot 方法. 蛋白样品制备: SMMC-7721 细胞以  $2.5 \times 10^8$ /L 接种于培养皿. 贴壁后分别加入各组细胞温育液. 48 h 后加入 RIPA 裂解液 150  $\mu$ L 将贴壁细胞刷下, 移入离心管内. 4 °C, 15 000 g 离心 15 min, 取上清, -20 °C 保存. 取 4  $\mu$ L 标准品或样品分别与考马斯亮蓝溶液 2 mL 混匀, 595 nm 波长处测吸光度. 计算每组样品浓度, 确定上样量. 电泳: 灌制分离胶和积层胶. 按以上计算结果平衡上样量, 余数用裂解液补齐. 95 °C 水浴 5 min. 倒入电泳缓冲液. 加样品和 Marker, 电压 90 V, 电泳 120 min. 转膜: 剪取硝酸纤维素滤膜贴于凝胶上, 并在转膜装置中放置冰盒. 加转移缓冲液. 电流 0.22 mA, 转膜 90 min. 杂交与检测: 滤膜以 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS 封闭抗原. 加入兔抗 P53 多克隆抗体, 稀释度 1:200, 4 °C, 摇床摇动过夜. TTBS 洗 3 次. 加入抗兔 Ig, 稀释度 1:2 000, 室温下摇动 1 h. TTBS 洗 3 次. 将滤膜浸入 ECL 中, 1 min 后取出, 暗匣内固定. 暗室中放入胶片. 曝光 15 min, 显影 2 min, 清水洗后再定影 5 min, 观察实验结果. 以  $\beta$ - 巯基乙醇洗膜后, 一抗加 p21<sup>WAF1</sup>/Cip1/Sdi1/Pic1 或 p16<sup>INK4a</sup>/MTS1 鼠单克隆抗体进行 P21 和 P16 蛋白的观察, 二抗为抗鼠 Ig.

统计学处理 采用双侧 t 检验.

## 2 结果

**2.1 SMMC-7721 肝癌细胞在 100 mL/L FBS 的 RPMI1640 培养液中生长良好, 对数生长期 4 d 后进入平台期(图 1).**

**2.2 胃肠安药物血清对 SMMC-7721 细胞增生的抑制作用** MTT 分析结果显示胃肠安及维甲酸药物血清对该细胞增生有抑制作用(表 1). 培养 16 h 后, 胃肠安组还原的 Alamar Blue 值与对照组相比明显减少( $P < 0.05$ ); 维甲酸组在 16, 24 h 与对照组相比有显著差异, 但随后的观察点未见显著差异; 胃肠安组在 32, 40, 48, 72 h 与维甲酸组相比有显著差异( $P < 0.05$ , 表 2).

表 1 药物血清对 SMMC-7721 细胞的抑制率(% ,  $n=5, \bar{x} \pm s$ )

分组	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
胃肠安组	11.0 $\pm$ 1.1	16.9 $\pm$ 2.1	21.4 $\pm$ 5.4	21.5 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	18.4 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
维甲酸组	12.3 $\pm$ 0.6	23.8 $\pm$ 2.4	21.5 $\pm$ 3.2	11.1 $\pm$ 0.6	7.5 $\pm$ 1.3

<sup>a</sup> $P=0.032$ , vs 维甲酸组.

**2.3 胃肠安药物血清对 SMMC-7721 细胞分泌甲胎蛋白和白蛋白的影响** 胃肠安组甲胎蛋白分泌量较对照组明显减少( $11.4 \pm 1.4 \mu\text{g/L}$  vs  $17.2 \pm 1.1 \mu\text{g/L}$ ,  $P=0.036$ ), 白蛋白分泌量较对照组明显增多( $0.40 \pm 0.02 \text{ mg/L}$  vs  $0.29 \pm 0.01 \text{ mg/L}$ ,  $P=0.043$ ); 维甲酸组甲胎蛋白量与白蛋白量较对照组也有减少与增多的趋势, 但统计未见明显差异.

表2 肝癌细胞还原 Alamar Blue 值(% ,  $n=5, \bar{x} \pm s$ )

分组	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h	72 h
胃肠安组	0.9 ± 1.0	7.5 ± 1.1	15.2 ± 1.6 <sup>a</sup>	25.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	29.4 ± 1.9 <sup>a, c</sup>	33.6 ± 2.0 <sup>a, c</sup>	38.3 ± 2.6 <sup>a, c</sup>	49.3 ± 3.3 <sup>a, c</sup>
维甲酸组	1.0 ± 0.6	9.7 ± 1.0	16.6 ± 1.6 <sup>a</sup>	29.7 ± 6.2 <sup>a</sup>	39.7 ± 3.9	49.1 ± 5.2	57.1 ± 7.7	80.9 ± 11.1
对照组	0.3 ± 1.2	9.5 ± 1.7	23.2 ± 2.9	39.8 ± 2.7	45.3 ± 4.7	52.9 ± 8.3	62.2 ± 13.5	84.1 ± 26.8

<sup>a</sup>P=0.021 vs 对照组; <sup>c</sup>P=0.038 vs 维甲酸组.

2.4 胃肠安药物血清对 SMMC-7721 细胞 P53, P16, P21 蛋白的影响 胃肠安组突变型 P53 蛋白表达较对照组和维甲酸组明显减少. 密度扫描积分: 胃肠安组 3 559, 维甲酸组 4 277, 对照组 4 042; 胃肠安组 P16 蛋白表达较维甲酸组和对对照组增多. 密度扫描积分: 胃肠安组 5 265, 维甲酸组 4 992, 对照组 4 797; 维甲酸组和胃肠安组 P21 蛋白表达较对照组增多. 密度扫描积分: 胃肠安组 6 171, 维甲酸组 6 764, 对照组 5 809.

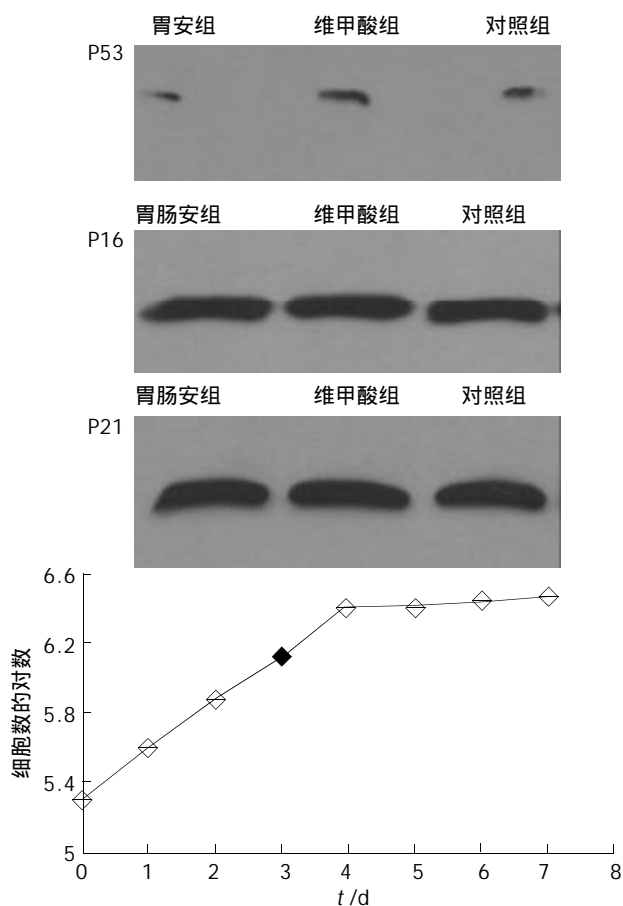


图1 SMMC-7721 人肝癌细胞生长曲线的观察.

### 3 讨论

SMMC-7721 人肝癌细胞是目前体外研究肝癌常用的细胞株<sup>[11-13]</sup>. 我们在细胞传代后 24h 添加药物血清, 作用 48 h 后观察实验结果. 全反式维甲酸具有诱导 Bel-7402 和 SMMC-7721 人肝癌细胞分化的作用<sup>[14, 15]</sup>, 因而本研究中以维甲酸为对照. MTT 法显示胃肠安及维甲酸药物血清对 SMMC-7721 细胞增生有一定的抑制作用, 维甲酸最大抑制作用出现在 24 h 和 48 h, 而胃肠安出现在

48 h 和 72 h. Alamar Blue 为一种染料, 在细胞培养上清液中可作为氧分子电子传递链的受体, 因而可以反映所研究的细胞对氧分子的消耗, 以观察细胞的代谢状况<sup>[16-19]</sup>. 与 MTT 分析法相比, Alamar Blue 法可以连续、快速地检测细胞的增生状态, 并且由于是对同一批细胞的增生状态进行观察, 因此有操作简便和几乎不干扰细胞正常代谢的特点. 结果显示胃肠安组细胞代谢状态最低, 表明胃肠安对该细胞增生具有抑制作用; 维甲酸组在 16、24 h 与对照组相比有差异, 但 24 h 后观察未见显著差异, 说明维甲酸抑制细胞增生的作用减弱. 综合 MTT 与 Alamar Blue 的结果, 胃肠安对 SMMC-7721 肝癌细胞增生有抑制作用. 与维甲酸相比, 其抑制作用起效慢, 但持续时间长. 甲胎蛋白和白蛋白是目前较为公认的反映肝癌细胞分化程度的指标, 甲胎蛋白是肝癌细胞去分化的标志, 而白蛋白是分化的标志. 实验结果显示胃肠安组细胞分泌的甲胎蛋白量较对照组明显减少, 而分泌的白蛋白显著增多, 提示胃肠安对该肝癌细胞具有诱导分化作用.

P53 过表达参与肝癌去分化和增生, 有研究显示 p53 基因突变与肝癌的分化等级、肝癌微血管侵犯显著相关, 可导致肿瘤早期转移, 是肝癌预后差的指标<sup>[20-28]</sup>. 本结果显示胃肠安组中突变型 P53 蛋白表达较对照组明显减少, 提示胃肠安方剂有降低 SMMC-7721 人肝癌细胞突变型 P53 蛋白表达的作用. P16 蛋白通过直接作用于 CDK4/6, 阻滞其与 CyclinD 结合, 避免 Rb 蛋白磷酸化及 E2F 因子释放, 将细胞周期停滞在 G1 期, 从而抑制细胞过度增生. 已发现 P16 蛋白表达缺失与肝癌分化密切相关<sup>[29-36]</sup>. 我们观察到胃肠安组细胞中 P16 蛋白表达较对照组增多, 提示胃肠安可能通过增加 P16 蛋白表达诱导该肿瘤细胞分化. p21 是调节细胞生长和分化的重要基因, 几乎能抑制与 Rb 基因磷酸化有关的所有周期素 - 周期素依赖激酶复合物<sup>[37-40]</sup>. 实验结果胃肠安组细胞中 P21 蛋白表达较对照组增多, 提示胃肠安方剂可能通过增加 P21 蛋白表达抑制细胞增生, 诱导细胞分化. 实验中观察到维甲酸组 P21 蛋白表达明显增多, 可能与维甲酸通过该作用环节诱导肝癌细胞分化有关.

分化是组织胚胎学概念. 细胞正常分化过程受到基因的严格调控. 本实验观察到中药复方胃肠安血清减少 SMMC-7721 人肝癌细胞突变型 P53 蛋白表达和增加 P16、P21 蛋白表达, 这可能是胃肠安诱导该肝癌细胞分化的分子生物学机制.

## 4 参考文献

- 1 Kanazawa T, Watanabe T, Kazama S, Tada T, Koketsu S, Nagawa H. Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. *Intern J Cancer* 2002;102: 225-229
- 2 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- 3 Yamamoto H, Ochiya T, Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saito I, Terada M. Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Research* 2002; 62:1641-1647
- 4 Faderl S, Keating MJ, Do KA, Liang SY, Kantarjian HM, O'Brien S, Garcia-Manero G, Manshouri T, Albitar M. Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2002;16: 1045-1052
- 5 Schmied BM, Ulrich AB, Matsuzaki H, El-Metwally TH, Ding X, Fernandes ME, Adrian TE, Chaney WG, Batra SK, Pour PM. Biologic instability of pancreatic cancer xenografts in the nude mouse. *Carcinogenesis* 2000;21:1121-1127
- 6 Charrad RS, Gadhoom Z, Qi J, Glachant A, Allouche M, Jasmin C, Chomienne C, Smadja-Joffe F. Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 2002;99:290-299
- 7 Chambery D, De Galle B, Ehrenborg E, Babajko S. Multi-hormonal regulation of IGFBP-6 expression in human neuroblastoma cells. *Growth Horm IGF Res* 2000;10:349-359
- 8 Liu P, Zhou JF, Hu YY, Liu CH, Lin C. Effect and significance of "benefiting qi and nourishing yin" on induction of hepatoma cell differentiation. *Zhongguo Zhongyi Jichu Yixue Zazhi* 2000; 6:29-34
- 9 Mao H, Zhang L, Wang Y, Li X. Experimental studies of icariin on anticancer mechanism. *Zhongyaocai* 2000;23:554-556
- 10 Elattar TM, Virji AS. Effect of tea polyphenols on growth of oral squamous carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* 2000; 20:3459-3465
- 11 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of Nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 12 Chan RC, Xie H, Zhao GP, Xie Y. Dendritomas formed by fusion of mature dendritic cells with allogenic human hepatocellular carcinoma cells activate autologous cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Letters* 2002;83:101-109
- 13 Fang Y, Jin JW, Zha XL. Role of FAK in TNF-alpha/Cycloheximide-induced apoptosis of SMMC-7721 cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2001;33:53-58
- 14 Wang L, Tang Z, Xue Q, Sun H, Chen J, Gao D, Zhao Y, Chen J, Sun R, Liu Y, Ye S. Effects of interferon-alpha on recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma after curative resection in nude mice. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:154-156
- 15 Chen HM, Huang W, Huang JQ. Effect of retinoic acid and sodium butyrate on expression of hepatocarcinoma specific enzymes. *J Pract Oncol* 2000;15:11-13
- 16 DeForge LE, Billeci KL, Kramer SM. Effect of IFN-gamma on the killing of *S. aureus* in human whole blood. Assessment of bacterial viability by CFU determination and by a new Method using alamarBlue. *J Immunol Methods* 2000;245:79-89
- 17 Back SA, Khan R, Gan X, Rosenberg PA, Volpe JJ. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *J Neurosci Methods* 1999;91:47-54
- 18 Mountzouros KT, Howell AP. Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2878-2884
- 19 Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar BlueTM. *J Immunol Methods* 2001;252:131-138
- 20 Liu H, Wang Y, Zhou Q, Gui SY, Li X. The point mutation of p53 gene exon7 in hepatocellular carcinoma from Anhui Province, a non HCC prevalent area in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:480-482
- 21 Qin LX, Tang ZY, Ma ZC, Wu ZQ, Zhou XD, Ye QH, Ji Y, Huang LW, Jia HL, Sun HC, Wang L. P53 immunohistochemical scoring: an independent prognostic marker for patients after hepatocellular carcinoma resection. *World J Gastroenterol* 2002;8:459-463
- 22 Martins C, Kedda MA, Kew MC. Characterization of six tumor suppressor genes and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *World J Gastroenterol* 1999;5:470-476
- 23 Peng XM, Peng WW, Yao JL. Codon 249 mutations of p53 gene in development of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:125-127
- 24 Ming L, Yuan B, Thorgeirsson SS. Characteristics of high frequency 249 codon mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma in prevalent area of China. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:122-124
- 25 Shao J, Li Y, Li H, Wu Q, Hou J, Liew C. Deletion of chromosomes 9p and 17 associated with abnormal expression of p53, p16/MTS1 and p15/MTS2 gene protein in hepatocellular carcinomas. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:817-822
- 26 Zhu Z, Zhu M, Ni C. Significance of p33(ING1b) and p53 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1332-1336
- 27 Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, Shao Y, Wu Z, Liu G, Wang X, Sun Z. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* 2002;36:1214-1220
- 28 Niu ZS, Li BK, Wang M. Expression of p53 and C-myc genes and its clinical relevance in the hepatocellular carcinomatous and pericarcinomatous tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:822-826
- 29 Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Chan JY, Hin LY, Lan WY, Lai PB, Lim BK, Huang J, Leung WT, Wu S, Lee JC. High frequency of p16INK4A gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1999;18:789-795
- 30 Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Lau WY, Hin LY, Lim BK, Lai PB, Chan JY, Wang XQ, Wu S, Lee JC. Frequent allelic loss on chromosome 9 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999;81:319-324
- 31 Luo D, Liu Q, Su J. The expression of p16, CDK4 and pRb in hepatocellular carcinomas. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 1999; 7:94-95
- 32 Jin M, Piao Z, Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, Jung HJ, Kim CG, Kim H. P16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:60-68
- 33 Suh SI, Pyun HY, Cho JW, Baek WK, Park JB, Kwon T, Park JW, Suh MH, Carson DA. 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Letters* 2000;160:81-88
- 34 Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2001;33:561-568
- 35 Azechi H, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Minata M, Katsuma H, Kuno M, Ito T, Komeda T, Kita R, Takahashi R, Nakao K. Disruption of the p16/cyclin D1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology* 2001;60:346-354
- 36 Huang J, Shen W, Li B, Luo Y, Liao S, Zhang W, Cheng N. Molecular and immunohistochemical study of the inactivation of the p16 gene in primary hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:889-893
- 37 Shi YZ, Hui AM, Takayama T, Li X, Cui X, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) protein expression is predominantly related to altered p53 in hepatocellular carcinomas. *British J Cancer* 2000;83:50-55
- 38 Gong Y, Deng S, Zhang M, Wang G, Minuk GY, Burczynski F. A cyclin-dependent kinase inhibitor (p21(WAF1/CIP1)) affects thymidine incorporation in human liver cancer cells. *British J Cancer* 2002;86:625-629
- 39 Yoshizawa K, Cioca DP, Kawa S, Tanaka E, Kiyosawa K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer* 2002;95:2243-2251
- 40 Suzui M, Masuda M, Lim JT, Albanese C, Pestell RG, Weinstein IB. Growth inhibition of human hepatoma cells by acyclic retinoid is associated with induction of p21 (CIP1) and inhibition of expression of cyclin D1. *Cancer Research* 2002;62:3997-4006



# 肝癌患者乙型肝炎病毒 X 基因变异的研究

代志琰, 徐启桓, 李 刚, 马会慧, 汤正好, 舒 欣, 姚集鲁

代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁, 中山大学附属第三医院传染科 广东省广州市 510630  
代志琰, 女, 1973-06-06 生, 四川省泸州市人, 汉族, 硕士, 讲师, 主要从事病毒性肝炎的分子生物学研究.  
广东省自然科学基金资助, No. 994030  
项目负责人: 徐启桓, 510630, 广东省广州市天河区石牌岗顶, 中山大学附属第三医院传染科. wn9898@163.com  
电话: 020-85516867-2019 传真: 020-85515940  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-26

## Study on X gene mutation of hepatitis B virus from patients with hepatocellular carcinoma

Zhi-Yan Dai, Qi-Huan Xu, Gang Li, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Xin Shu, Ji-Lu Yao

Zhi-Yan Dai, Qi-Huan Xu, Gang Li, Hui-Hui Ma, Zheng-Hao Tang, Xin Shu, Ji-Lu Yao, Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 994030  
Correspondence to: Qi-Huan Xu, Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. wn9898@163.com  
Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-03-26

## Abstract

AIM: To study the association of mutations of hepatitis B virus(HBV) X gene with hepatocellular carcinoma(HCC).

METHODS: The complete X region of HBV from the serum of 5 patients with HCC and 12 patients with chronic hepatitis B (CH) was amplified by PCR and then the purified PCR products were sequenced.

RESULTS: A comparison of 492bp nucleotide sequence of the HBV X gene from 5 HCC patients with that of the several previously reported isolates of different serotype in Genebank showed that the nucleotide homology was 89-96 % and most of the strains were similar to serotype adw. The number of nucleotide changes in the X gene of HBV from HCC group ( $19.4 \pm 12.1$ ) was significantly greater than that from the CH group ( $4.4 \pm 2.4$ ,  $P = 0.00093$ ). There were 4 models of substitutions in X gene and 6 hot spots found in HCC group and 12 hot spots found in HCC group.

CONCLUSION: The mutations of HBV X gene may be closely associated with the development of HCC.

Dai ZY, Xu QH, Li G, Ma HH, Tang ZH, Shu X, Yao JL. Study on X gene mutation of hepatitis B virus from patients with hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1349-1352

## 摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒(HBV) X基因变异在肝癌发生中

的作用.

方法: 应用聚合酶链反应(PCR)技术从5例肝细胞癌患者及12例慢性乙型肝炎患者血清中扩增X基因, 然后将纯化的PCR产物进行序列测定, 对获得的序列进行变异性及同源性分析.

结果: 肝细胞癌患者中得到的HBV X基因序列与Genebank中多个已发表的HBV各血清亚型序列进行同源性比较, 发现核苷酸同源性在89-96%之间, 血清亚型以adw为主. 与非肝癌组的比较发现X基因序列的替换突变中存在4种形式. 6个位点的变异仅出现于肝癌组, 12个热点变异多见于肝癌组而少见非肝癌组.

结论: X基因序列的突变与肝细胞癌的发生有关.

代志琰, 徐启桓, 李刚, 马会慧, 汤正好, 舒欣, 姚集鲁. 肝癌患者乙型肝炎病毒X基因变异的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1349-1352  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1349.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)基因组含有4个开放读码框架<sup>[1]</sup>, 分别为S, C, P, X区. 对HBV X基因的研究集中在其在肝癌发生中的重要作用<sup>[2-8]</sup>. 我们以X区为研究靶区域, 应用聚合酶链反应(PCR)扩增肝细胞癌(HCC)患者血清中的HBV X基因, 将获得的序列与来自基因库及非HCC的慢性乙型肝炎患者血清中HBV X基因序列进行比较, 了解X基因突变与HCC的关系.

## 1 材料和方法

1.1 材料 我院2002-01-12住院患者HCC组5例, 年龄 $48 \pm 17$ 岁, 男4例, 女1例, ALT $102.6 \pm 40.0$  IU/L, HBVDNA  $1.1 \pm 1.9 \times 10^7$  copies/mL, 两对半(A为HBsAg、HBeAg、抗-HBc阳性; B为HBsAg、抗-HBe、抗-HBc阳性)A3例, B2例; 非HCC组12例, 年龄 $29 \pm 10$ 岁, 男12例, 女1例, ALT  $257.9 \pm 625.4$  IU/L, HBVDNA  $5.4 \pm 7.0 \times 10^8$  copies/mL, 两对半A10例, B2例. 诊断标准按照2000年西安第10次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》, 患者均无应用HBV疫苗史和抗病毒治疗史, 其他肝炎病毒标志物检测阴性.

1.2 方法 取血清100  $\mu$ L加TES 300  $\mu$ L (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS, 150 mg/L 蛋白酶K), 65  $^{\circ}$ C 3 h, 常规酚:氯仿:异戊醇(V:V:V; 25:24:1)

抽提, 乙醇沉淀, DNA 溶解于双蒸水 20  $\mu$ L 中,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用. 设计引物, P1: 5-CCA AGC TTC ATC ATT TCC ATG G-3; P2: 5-TGG ATC CAA GAG ATG ATT AGG-3; P3: 5-TTT TGC TCG CAG CCG GTC T-3; P4: 5-TGC TTG AAC AGT AGG ACA TG-3. 引物由北京赛百盛公司合成. 肝癌组扩增用巢式 PCR(其中仅 1 号用 1 次 PCR, 引物为 P3、P4), 即外引物为 P3、P4, 内引物为 P1、P2, 目的片段长度为 492 个 bp; 非肝癌组用 1 次 PCR, 引物为 P3、P4, 目的片段长度为 578 个 bp. PCR 参数如下:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min 预变性,  $94^{\circ}\text{C}$  30 s 变性,  $53^{\circ}\text{C}$  40 s 退火,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min 延伸, 共 32 个循环,  $72^{\circ}\text{C}$

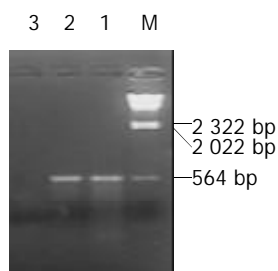
总延伸 10 min. 选 HBV 全基因组质粒(本室保存)相同条件扩增产物作为阳性对照, 健康人血清(两对半及血清 HBVDNA 均阴性)作为阴性对照. 将 PCR 产物在 20 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 经 QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN, 德国)回收 DNA, 测序由大连宝生物工程公司完成. 序列变异性及同源性分析用 DNASTAR 软件分析.

## 2 结果

从患者血清中扩增出 HBV X 基因, 电泳后可见 PCR 产物长度约 578 bp, 与预期大小相符(图 1). 肝癌组与非肝癌组 X 基因序列同源性比较的百分比值如表 1.

表 1 肝癌组(1-5)与非肝癌组(6-17) X 基因序列同源性比较

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1		92.9	97.8	92.9	91.7	95.7	90.4	90.9	90.7	91.1	97.6	90.0	88.4	91.3	91.1	90.7	91.3
2			91.7	97.8	96.1	90.4	94.7	97.0	96.7	96.7	90.7	95.5	94.1	97.0	96.7	96.1	95.7
3				91.7	91.5	95.7	90.2	90.7	90.4	90.9	95.9	89.8	88.2	90.9	91.1	90.4	91.1
4					97.0	89.4	95.3	96.7	96.1	96.1	90.4	94.9	93.7	96.3	96.1	95.7	96.5
5						90.5	97.4	98.1	97.9	97.9	91.7	97.1	93.1	98.3	97.9	97.8	98.4
6							90.0	90.8	91.3	91.7	97.9	90.7	86.9	91.7	91.3	91.0	90.8
7								97.2	97.6	97.4	91.0	96.9	93.3	97.8	97.8	97.1	97.9
8									98.8	98.8	90.8	97.9	94.1	99.1	98.8	98.6	98.3
9										99.3	91.3	98.1	94.1	99.3	99.0	98.6	98.4
10											91.7	98.1	94.1	99.3	99.0	98.8	98.4
11												90.7	86.9	91.7	91.3	91.2	91.9
12													94.1	98.4	98.4	97.9	97.6
13														94.5	94.5	93.9	93.6
14															99.3	99.1	98.8
15																98.8	98.4
16																	98.6



M: DNA marker; 1: 肝癌组 1 号; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照.  
图 1 HBV X 基因 PCR 产物.

2.1 HBV X 基因序列在 Genebank 中的同源性比较 肝癌组 5 例所得序列与 Genebank 中 HBV 多个已发表的各血清亚型序列进行同源性比较, 发现 5 例患者与多个已知分离株的相应序列的核苷酸同源性在 89-96 % 之间, 推导的氨基酸序列同源性在 80-99 %, 其中 3 例为 adw 亚型, 2 例为 ayr 亚型. 非肝癌组 12 例慢性乙型肝炎患者与多个已知分离株的相应序列的核苷酸同源性在 87-96 % 之间, 推导的氨基酸序列同源性在 86-98 %, 其中 10 例为 adw 亚型, 2 例为 ayr 亚型.

其中 10 例为 adw 亚型, 2 例为 ayr 亚型.

2.2 HBV X 基因序列的变异性分析 肝癌组序列分析发现, HBV X 区的替换突变表现为散在分布, 但相对集中于核苷酸序列的 nt 1 358-1 365, nt 1 490-1 502, nt 1 634-1 675, nt 1 721-1 801 四个区域, 分析核苷酸序列时发现替换突变中存在 4 种形式, 第 1 种形式是突变具有广泛性, HBV X 基因序列发生变异位点数肝癌组高于非肝癌组(分别为  $19.4 \pm 12.1$ ,  $4.4 \pm 2.4$ ,  $P=0.00093$ ), 多个患者的核苷酸序列在某个位点均突变为同一的碱基, 如肝癌组 5 例标本中有 4 例 nt 1 359 A  $\rightarrow$  C, nt 1 362 T  $\rightarrow$  G, nt 1 363 A  $\rightarrow$  C, nt 1 365 A  $\rightarrow$  T, nt 1 813 T  $\rightarrow$  C, nt 1 859 A  $\rightarrow$  T, 且此类变异仅出现于肝癌组而不见于非肝癌组; 第 2 种形式为突变具有个体特异性, 如患者 5 在 nt 1 440 G  $\rightarrow$  T, 在 nt 1 705 A  $\rightarrow$  G, 患者 14 在 nt 1 564 C  $\rightarrow$  T, 患者 17 在 nt 1 599 C  $\rightarrow$  G; 第 3 种形式存在热点变异, 我们结合两组病例, 对 492 个碱基替换的频率进行统计, 有 12 处位点为高发突变位点(17 例中有 5 例以上

在该位点发生替换, 频率大于 28.8%), 即热点变异, 且此类变异多出现于肝癌组而少见非肝癌组见表 2; 第 4 种形式为散在的随机替换, 最为常见. HBV X 区的直接重复序列 (DR2, nt 1 590-1 600; DR1, nt 1 824-1 834)、基本核心启动子 (BCP) 的第 3 个 AT 富集区 (nt 1 789-1 795) 在全部肝癌组 5 例和非肝癌组 12 例中均无变异发生. T1 764 A1 766 联合突变见于肝癌组 4 例和非肝癌组 3 例中.

表 2 HBV X 区核苷酸热点变异

碱基变异位点	肝癌组	非肝癌组	合计
nt 1 361 G → A	4	2	6
nt 1 466 C → T	3	2	5
nt 1 490 C → T	3	2	5
nt 1 510 A → T	3	2	5
nt 1 640 C → T	3	2	5
nt 1 644 G → A	3	2	5
nt 1 764 A → T	4	3	7
nt 1 766 G → A	4	3	7
nt 1 859 A → T	5	2	7

### 3 讨论

HBV 感染在 HCC 发生中起着重要作用<sup>[9-19]</sup>. HBV 的变异是较普遍的现象, 可能与其聚合酶缺乏校正功能, 以及 HBV 承受宿主巨大的免疫压力有关. HBV X 蛋白是一种具有反式作用的调节蛋白, 能直接或间接激活 c-myc、c-fos、c-jun 和 ras 等肿瘤基因<sup>[20-23]</sup>, 他不仅能活化 HBV 自身的启动子, 而且能活化一些异源病毒和细胞启动子, 参与对细胞的基因表达的调控<sup>[24-29]</sup>, 从而与 HCC 的发生发展相关.

HBV 进入人体后病毒基因组发生相对较为特殊的突变<sup>[30, 31]</sup>, 以最大限度地适应宿主环境, 从而得以长期在体内持续存在. 我们通过应用 PCR 扩增、序列测定等分子生物学技术, 获得 5 份 HCC 及 12 份非 HCC 标本中 HBV X 基因的核苷酸序列, 与 Genebank 中 HBV 多个已发表的各血清亚型序列进行同源性比较, 发现 HCC 组与非 HCC 组的 HBV 亚型分布类似, 核苷酸及推导的氨基酸序列同源性分析均提示以 adw 亚型为主. HBV X 基因序列的变异性分析则发现 HCC 组与非 HCC 组的 HBV X 区突变有所不同, HBV X 基因序列发生变异的位点数 HCC 组高于非 HCC 组, HCC 标本中 HBV X 基因序列的变异具有一定的特征, 有 6 处变异仅出现于 HCC 组而不见于非 HCC 组, 有 12 处位点为高发突变位点, 多见于 HCC 组, 而少见非 HCC 组, 由此推断这些热点位点的突变可能在 HCC 的发生中起重要作用.

T1764A1766 联合突变常见于 HCC 患者, 本研究也在 HCC 组 4 例和非 HCC 组 3 例中测出此类变异, 而这两处突变正处在增强子 2 和 C 启动子序列中, 位于

反式转录激活必需序列的上游. 目前认为 X 蛋白的反式转录激活作用还包括很强的调节作用, N 端 1 / 3 为负调节区, C 端为正调节区. 因此. 我们推测这两处突变类型可能使反式转录激活作用增强, 包括 HBV X 蛋白表达增加, 在致病或致癌过程中起重要作用.

HBV 感染易导致慢性化, 而经慢性肝炎与肝硬化进展为 HCC 是一个缓慢的连续的过程. 通过比较 HCC 与非 HCC 标本中 HBV X 基因核苷酸序列将有助于了解 HBV X 基因在 HCC 发生中的作用, 发现 HBV X 基因在致癌过程中的变异规律是对 HCC 发病机制研究上的一个飞跃. 虽然, 现有结果不足以阐明病毒变异与病变的因果关系, 但已能明确, HBV X 基因核苷酸序列的突变有其规律可循, 与 HCC 的发生发展有着密切的联系. 进一步的研究须以细胞转染和动物实验相结合, 结合机体免疫对变异株的应答来认识 HBV X 基因在 HCC 发生中的作用, 要完全阐明 HBV X 基因序列的变异与 HCC 的关系尚须研究更大量的标本.

### 4 参考文献

- Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 王小众, 陶其敏. 乙型肝炎 X 基因与肝癌. *世界华人消化杂志* 1999;7:1063-1064
- Xu ZH, Zhao MJ, Li TP. p73  $\beta$  inhibits transcriptional activities of enhancer I and X promoter in hepatitis B virus more efficiently than p73 $\alpha$ . *World J Gastroenterol* 2002;8:1094-1097
- Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- Guo SP, Ma ZS, Wang WL. Construction of eukaryotic expression vector of HBV x gene. *World J Gastroenterol* 1999;5:351-352
- Xiong J, Yao YC, Zi XY, Li JX, Wang XM, Ye XT, Zhao SM, Yan YB, Yu HY, Hu YP. Expression of hepatitis B virus X protein in transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:112-116
- Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- 徐迪雄, 陈文生, 叶治家. 生长因子受体反义基因逆转肝癌细胞的恶性表型. *世界华人消化杂志* 2001;9:175-179
- 卢斌, 戴益民. 肝癌发生中细胞周期调控的异常. *世界华人消化杂志* 2001;9:205-208
- 张静, 王文亮, 李青, 乔庆.  $\alpha$  - 转化生长因子及其受体在人原发性肝细胞肝癌中的表达意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:939-942
- 刘枫. 原发性肝癌 90 例 HBV 感染临床分析. *世界华人消化杂志* 1999;7:877
- 张利宁, 孙汶生, 曹英林, 马春红, 宋静. HBV DNA 在肝癌细胞中的整合模式. *世界华人消化杂志* 1999;7:609
- 刘为纹. 肝细胞性肝癌病因学研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:93-95
- 刘建生, 彭淑牖, 吴育连, 彭承宏, 陈怀增, Gao YY. 原发性肝癌 hSSTR2.5mRNA 的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1308
- 邵润轩, 王江滨, 王宵伟. 凋亡相关因子 Fas/FasL 在慢性肝炎、原发性肝癌表达的规律. *世界华人消化杂志* 2000;8:937-939
- 崔俊, 杨冬华. CSF-1 受体 /c-fms 与肝癌. *世界华人消化杂志* 2000;8:696-697

- 18 Staib F, Hussain SP, Hofseth LJ, Wang XW, Harris CC. TP53 and liver carcinogenesis. *Hum Mutat* 2003;21:201-216
- 19 Jayshree RS, Sridhar H, Devi GM. Surface, core, and X genes of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma: an in situ hybridization study. *Cancer* 2003;99:63-67
- 20 Nijhara R, Jana SS, Goswami SK, Rana A, Majumdar SS, Kumar V, Sarkar DP. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes in vivo. *J Virol* 2001;75:10348-10358
- 21 金顺钱, 詹启敏. 肿瘤分子生物学是基础医学研究的前沿. 世界华人消化杂志 2002;10:678-680
- 22 Lakhtakia R, Kumar V, Reddi H, Mathur M, Dattagupta S, Panda SK. Hepatocellular carcinoma in a hepatitis B 'x' transgenic mouse model: A sequential pathological evaluation. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:80-91
- 23 Chun E, Lee J, Cheong HS, Lee KY. Tumor eradication by hepatitis B virus X antigen-specific CD8+ T cells in xenografted nude mice. *J Immunol* 2003;170:1183-1190
- 24 Kim JH, Rho HM. Activation of the human transforming growth factor alpha (TGF-alpha) gene by the hepatitis B viral X protein (HBx) through AP-2 sites. *Mol Cell Biochem* 2002;231:155-161
- 25 Madden CR, Finegold MJ, Slagle BL. Altered DNA mutation spectrum in aflatoxin b1-treated transgenic mice that express the hepatitis B virus x protein. *J Virol* 2002;76:11770-11774
- 26 Zhu Z, Zhu M, Ni C. Significance of p33(ING1b) and p53 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:1332-1336
- 27 Li QF, Ou-Yang GL, Peng XX, Hong SG. Effects of tachyplesin on the regulation of cell cycle in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:454-458
- 28 郑建勇, 李开宗, 王为忠. 肝癌组织中 p27KIP1 基因的表达及其与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:883-886
- 29 Sohn S, Jaitovitch-Groisman I, Benlimame N, Galipeau J, Batist G, Alaoui-Jamali MA. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. *Mutat Res* 2000;460:17-28
- 30 Bergametti F, Sitterlin D, Transy C. Turnover of hepatitis B virus X protein is regulated by damaged DNA-binding complex. *J Virol* 2002;76:6495-6501
- 31 Livezey KW, Negorev D, Simon D. Increased chromosomal alterations and micronuclei formation in human hepatoma HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBx gene. *Mutat Res* 2002;505:63-74

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

## • 读者来信 •

贵刊内容越办越好, 杂志影响逐年增大, 这与你们多年的不懈的努力分不开; 这是你们不断创新、广开思路、勇于进取、辛勤劳动等的结果. 我作为你们的编委, 很自豪; 我也很希望能给你们贡献一点力量.

我最近在网阅读到贵刊的的杂志内容摘要, 希望能在网上读到你们杂志的全文; 今后就不用再邮寄杂志了, 也可以为你们节约一点经费. 我希望贵刊的中文杂志内容选择上能尽量精一点.

我研究的领域主要在胃肠肿瘤的激光诊治和基因治疗方面, 主编过国内第一部激光诊治胃肠肿瘤的专著 - 《胃肠肿瘤与现代激光》, 获得过一些成果, 发表论文 30 篇, 获得过三项国家自然科学基金; 最近被选为中华医学会重庆激光医学专委会主任委员. 我的专长就在这些方面; 在这些方面我可能为你们做点什么. (陈祖林 2003-08-03)



# 复方中药99-克星超声介入治疗肝癌裸鼠移植瘤凋亡与增生

林晓东, 林礼务, 何以救, 高上达, 杨发端, 薛恩生

林晓东, 林礼务, 何以救, 高上达, 薛恩生, 福建省超声医学研究所, 福建医科大学附属协和医院超声科 福建省福州市 350001  
杨发端, 福建医科大学附属协和医院病理科 福建省福州市 350001  
林晓东, 男, 1971-07-10生, 福建省福州人, 汉族. 1993年福建医科大学本科毕业, 主治医师. 主要从事超声介入治疗肝癌研究.  
福建省科委基金资助课题, No. 2000Z138  
项目负责人: 林礼务, 350001, 福建省福州市, 福建省超声医学研究所, 福建医科大学附属协和医院超声科. lxdghl@163.net  
电话: 591-3357896 传真: 591-3357896  
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-02-19

## Apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma in nude mice with percutaneous intratumor injection of Chinese herbal medicine "Star-99"

Xiao-Dong Lin, Li-Wu Lin, Yi-Mi He, Shang-Da Gao, Fa-Duang Yang, En-Sheng Xue

Xiao-Dong Lin, Li-Wu Lin, Yi-Mi He, Shang-Da Gao, En-Sheng Xue, Department of Ultrasound, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China  
Fa-Duang Yang, Department of Pathology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China  
Supported by the Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Fujian Province, No. 2000Z138  
Correspondence to: Li-Wu Lin, Department of Ultrasound, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. lxdghl@163.net  
Received: 2003-01-15 Accepted: 2003-02-19

## Abstract

**AIM:** To probe the anti-cancer effect of ultrasound-guided local injection with Chinese traditional medicine "Star-99" in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** Twenty-eight human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 transplantation nude mice were randomly divided into Star-99 group containing (14 patterns), ethanol group (7 patients) and saline group (7 patterns). Ten days after transplantation, the medicine was injected into the tumors of all the nude mice every 5 days. On day 20 after the first injection, the nude mice were killed. Immunohistochemistry assay was adopted to detect the expression of Ki-67 antigen in HCC. The tumor tissues were sent for flow cytometry (FCM) and DNA analysis. Apoptotic cells were visualized by TUNEL assay. All the experiments were carried out under double blind.

**RESULTS:** The Ki-67 Labeling index in Star-99 group ( $17 \pm 9\%$ ) and ethanol group ( $21 \pm 11\%$ ) was significantly lower than that in saline group ( $32 \pm 13\%$ ) ( $P < 0.05$ ). The mean apoptotic index (AI: percentage of TUNEL signal positive cells) in Star-99 group ( $49 \pm 5\%$ ) was significantly higher than that in ethanol group ( $12 \pm 2\%$ ) and the saline group ( $10 \pm 4\%$ ) ( $P < 0.01$ ). FCM and DNA analysis showed that the appearance rate of the apoptosis peak in Star-99 group

was  $93\%$ , markedly higher than that in ethanol group ( $14\%$ ) and saline group ( $0\%$ ) ( $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Star-99 can inhibit cancer cells proliferation remarkably and induce the cancer cell apoptosis. It has strong effects of inhibiting and destructing cancer cells. Its curative effect is as good as the ethanol. Its major mechanisms can be as follows: (1) It can inhibit cancer cell proliferation. (2) It can induce cancer cell apoptosis. The mechanism of Star-99 is different from that of ethanol. The mechanisms of inhibiting cancer cell proliferation and inducing cell apoptosis is of great significance. This study will provide a new pathway for drug administration and an experimental basis for the treatment of HCC with traditional Chinese herbal. The study of Star-99 in the treatment of tumor is of profound significance and has good prospects.

Lin XD, Lin LW, He YM, Gao SD, Yang FD, Xue ES. Apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma in nude mice with percutaneous intratumor injection of Chinese herbal medicine "Star-99". *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1353-1356

## 摘要

**目的:** 探讨超声引导瘤内注射复方中药99-克星治疗肝癌SMMC-7721裸鼠移植瘤的抗癌作用。

**方法:** 取人肝癌SMMC-7721裸鼠皮下移植模型28只, 随机分为99-克星中药治疗组14只, 无水乙醇与生理盐水治疗组各7只. 全部裸鼠在接种10 d后每隔5 d向肿瘤内注入治疗药物共4次, 治疗20 d后处死. 应用免疫组织化学方法检测移植瘤细胞Ki-67抗原的表达并行流式细胞仪(FCM) DNA分析以及采用TUNEL方法对移植瘤细胞凋亡现象进行观察。

**结果:** 中药99克星组与乙醇组的Ki-67指数分别为  $17 \pm 9\%$ 、 $21 \pm 11\%$ , 均显著低于盐水组的  $32 \pm 13\%$  ( $P < 0.05$ ); 克星组凋亡指数高达  $49 \pm 5\%$ , 显著高于乙醇组的  $12 \pm 2\%$  和盐水组的  $10 \pm 4\%$  (均  $P < 0.01$ ); FCM DNA分析显示盐水组的异倍体峰出现率高达  $57\%$ , 明显高于克星组的  $7\%$  与乙醇组的  $0\%$  (均  $P < 0.05$ ), 而克星组的凋亡峰出现率高达  $93\%$ , 明显高于乙醇组的  $14\%$  与盐水组的  $0\%$  (均  $P < 0.01$ ).

**结论:** 复方中药99克星能显著抑制裸鼠移植瘤细胞的增生, 并诱发其凋亡. 研究结果表明复方中药99克星具有强大的破坏与抑制肿瘤细胞生长的作用, 其疗效不亚于无水乙醇, 其主要机制可能有: (1) 抑制癌细胞的增生, (2) 诱导癌细胞凋亡. 复方中药99-克星抗肿瘤的作用机制不同于无水乙醇, 尤其以抑制癌细胞增生和诱导癌细胞凋亡的作用

机制在抗肿瘤中具有重要的意义.本研究为传统中药治疗肝癌提供了一个新的给药途径与理论依据,其在肿瘤治疗研究中具有重要的意义和良好的发展前景.

林晓东, 林礼务, 何以枚, 高上达, 杨发端, 薛恩生. 复方中药99-克星超声介入治疗肝癌裸鼠移植瘤凋亡与增生. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1353-1356  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1353.asp>

## 0 引言

我国肝癌常见超声引导介入治疗肝癌的方法依然存在一定的局限性<sup>[1-10]</sup>.复方中药99-克星有强大的抑制肿瘤生长的作用,并且其作用机制明显不同于无水乙醇<sup>[11,12]</sup>.为进一步探讨超声引导经皮瘤内注射复方中药99-克星的疗效机制,我们通过应用免疫组织化学方法检测移植瘤细胞Ki-67抗原的表达并行流式细胞仪(FCM)DNA分析、TUNEL方法对细胞凋亡现象进行观察以评价99-克星抑制肝癌细胞增生与诱导肝癌细胞凋亡的生物效应.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验动物由厦门大学抗癌中心医学实验动物室(合格证号:闽医动字第23-007号)提供的5-8周龄BALB/CA裸鼠(SPF级,雌雄兼用),质量 $18.0 \pm 2.1$  g,在无病原体的层流架内饲养,无菌操作下定期更换笼具、垫料、饮用水和标准饲料(由上海必凯公司提供).将人肝癌SMMC-7721细胞培养悬液离心后去上清,再加细胞培养液配成 $5 \times 10^{10}$ /L,在裸鼠背部皮下注射0.2 mL.当肿瘤长至1 cm左右时,无菌条件下取下部分瘤块,切成 $0.2 \times 0.2 \times 0.2$  cm瘤块,用套管针移植到另一只裸鼠背部皮下,形成皮下移植并传代.

**1.2 方法** 接种人肝癌移植瘤裸鼠28只,随机分3组:中药99-克星组(下称克星组,主要成分为天南星、丹参与黄芪等)14只,无水乙醇组(下称乙醇组)7只,生理盐水组(下称盐水组)7只.实验动物接种后10 d,采用高频超声(日本ALOKA-5500超声仪,探头频率10 MHz)测量肿瘤最大长径、宽径与厚径,并计算体积.以5号针头刺入肿瘤中心,缓缓注入各组药物0.1 mL,每隔5 d注射1次,共4次,在末次注射5 d后再超声测量肿瘤三径后将裸鼠处死.应用免疫组织化学方法检测Ki-67抗原的表达.石蜡标本4  $\mu$ m厚连续切片,免疫组化采用SP法.鼠抗人Ki-67单克隆抗体MIB1(即用型)、S-P免疫组化试剂盒购自福州迈新公司,参照说明书及文献操作. Ki-67抗原阳性产物定位于细胞核内,呈褐色或黄褐色颗粒状,胞质一般不着色.部分细胞核分裂时显示出整个细胞的阳性反应.采用北京航天航空大学CMIAS医学图像分析系统,每个标本在低倍镜( $\times 100$ )下观察并确定有代表性的Ki-67染色阳性视野,连续观察10个高倍视野( $\times 400$ ),计算每个高倍视野瘤细胞中的阳性数.计算肿瘤Ki-67指数(Ki-67 Labeling index Ki-

67 LI),  $Ki-67 LI = \text{阳性细胞总和} / \text{计数细胞总数} \times 100\%$ .采用末端转移酶介导的dUTP切口末端标记方法(TUNEL)检测凋亡细胞.试剂盒(POD法)购自福州迈新公司(德国Boehringer Mannheim公司生产),参照说明书及文献操作. TUNEL染色以细胞核有明显棕黄色颗粒为阳性,采用北京航天航空大学CMIAS医学图像分析系统,每张切片观察10个高倍视野( $\times 400$ ),随机计数不少于1 000个细胞的阳性细胞数.计算肿瘤细胞凋亡指数(Apoptotic index, AI),  $AI = \text{凋亡细胞数} / \text{计数细胞总数} \times 100\%$ .取新鲜肿瘤组织制备细胞混悬液行FCM DNA分析, FCM分析DNA的异倍体峰与凋亡峰的出现率.

统计学处理 实验数据经SPSS for Windows 8.0软件包行单因素方差分析和 $\chi^2$ 检验统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

## 2 结果

99-克星组与乙醇组的Ki-67指数分别为 $17 \pm 9\%$ ,  $21 \pm 11\%$ ,均显著低于盐水组的 $32 \pm 13\%$  ( $P < 0.05$ ) (图1).克星组凋亡指数AI为 $49 \pm 5\%$ ,明显高于乙醇组的 $12 \pm 2\%$ 和盐水组的 $10 \pm 4\%$  ( $P < 0.01$ ) (图2).盐水组中57% (4/7)出现异倍体峰(图3),显著高于未出现异倍体峰的乙醇组0% (0/7)与克星组的7% (1/14) ( $P < 0.05$ ).另一明显特点是克星组有93% (13/14)见亚G<sub>1</sub>期细胞形成的凋亡峰(图4),显著高于乙醇组的14% (1/7) ( $P < 0.01$ ),而盐水组无1例出现凋亡峰.

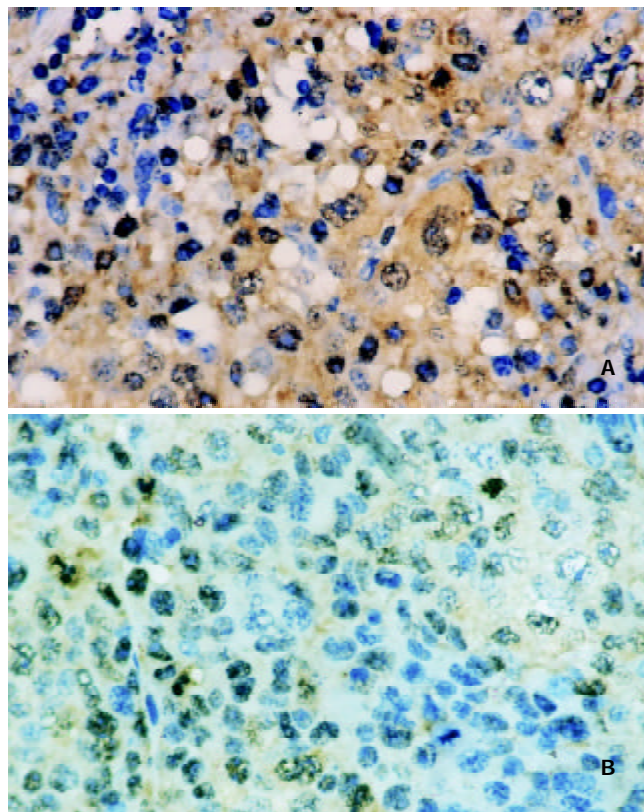


图1 裸鼠肝癌组织的Ki-67标记 $\times 400$ (细胞核有明显棕黄色颗粒为阳性).  
A: 99-克星组;  
B: 盐水组.



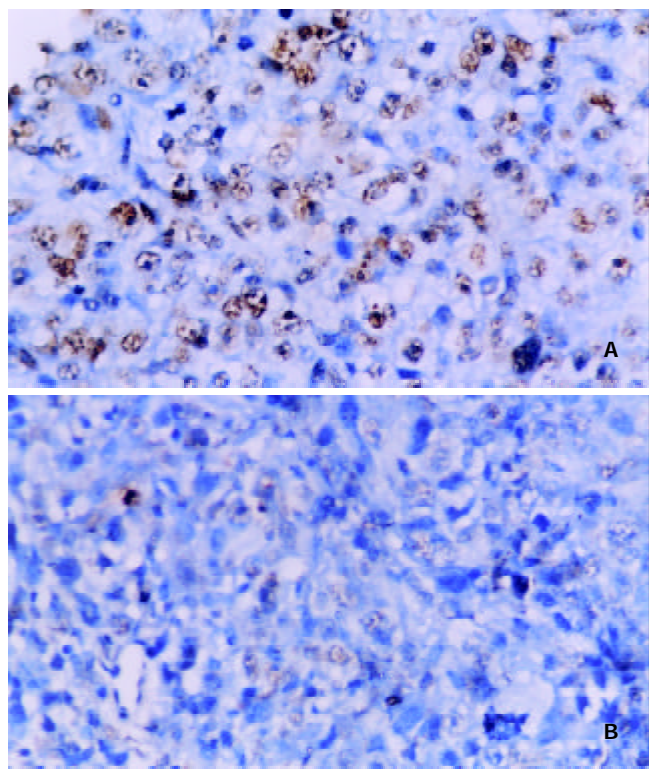


图2 裸鼠肝癌组织的TUNEL 标记  $\times 400$  (细胞核有明显棕黄色颗粒为阳性).  
A: 99- 克星组.  
B: 盐水组.

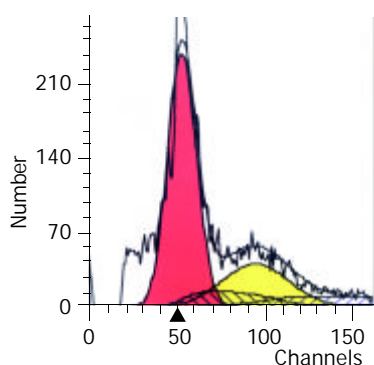


图3 注射生理盐水裸鼠肝癌组织 FCM DNA 分析出现异倍体峰(图中黄色峰).

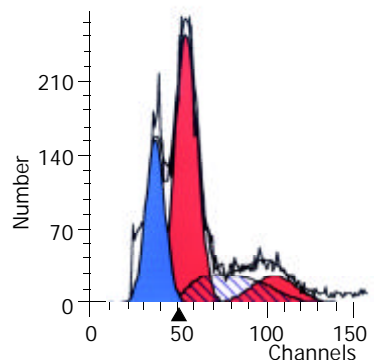


图4 注射 99- 克星裸鼠肝癌组织 FCM DNA 分析出现凋亡峰(图中蓝色峰).

### 3 讨论

临床上已有多种超声引导介入治疗肝癌的方法, 近年来国内外相继推出激光、微波、射频以及高能聚焦超

声等在超声引导下介入治疗肝癌, 其中有的疗效甚至可与外科手术切除相媲美<sup>[2-5]</sup>. 但是以上多种方法依然存在一定的局限性<sup>[6-10]</sup>. 我们发现 99- 克星有强大的抑制肿瘤生长的作用, 其疗效不亚于无水乙醇<sup>[11, 12]</sup>. 病理细胞学和组织学观察也显示, 克星组肿瘤细胞出现肿胀、变性坏死与程序性坏死为主的特征性改变, 与乙醇组肿瘤组织呈凝固性坏死为主的改变明显不同. 更为独特的是, 克星组所有的变性肿胀肿瘤组织中同时出现许多淋巴细胞, 甚至形成淋巴细胞团, 而乙醇治疗组未见到明显的淋巴细胞. 这一发现提示复方中药 99- 克星能够促进机体局部组织炎症反应和淋巴细胞活跃, 其抑制或杀伤肿瘤细胞的作用很可能与细胞免疫功能增强机制有关, 他与无水乙醇单纯杀灭肿瘤细胞而缺乏组织反应的作用机制显然不同<sup>[11, 12]</sup>. 因此值得进一步深入研究其作用机制.

Ki-67 是一种敏感而特异的增生期细胞标记物, 他可能是一类新的细胞核非组织蛋白<sup>[13-15]</sup>, 与细胞周期密切相关. Ki-67 抗原与细胞 DNA 半保留复制相藕连, 在有丝分裂的 G1, G2, M, S 期都表达, 其中 G2, M 期表达最强, G0 期不表达<sup>[16, 17]</sup>. 因其半衰期短, 细胞脱离增生周期后迅速降解, 检测结果的可靠性明显优于目前常用的半衰期长的增生期细胞标记物即增生细胞核抗原(PCNA), 肿瘤细胞增生越活跃, 肿瘤细胞 ki-67 表达水平亦相应增高, 因此被视为较可靠的全面反映细胞群体增生水平的指标<sup>[18-20]</sup>. 本实验结果显示 99 克星组与乙醇组的 Ki-67 指数分别为  $17 \pm 9\%$ 、 $21 \pm 11\%$ , 均显著低于盐水组的  $32 \pm 13\%$  ( $P < 0.05$ ). 99 克星组与乙醇组移植瘤细胞 ki-67 表达明显减弱, 表明大量的癌细胞处于细胞增生周期的静止期, 提示 99 克星与乙醇一样能阻止癌细胞进入分裂期, 从而抑制肿瘤的生长. 这表明 99 克星与乙醇一样能显著抑制肝癌细胞的增生, 从而抑制裸鼠 SMMC-7721 移植瘤生长.

调控细胞凋亡成为目前肿瘤治疗研究的一个新热点<sup>[21-25]</sup>. 我们应用 TUNEL 法检测发现克星组的凋亡指数高达  $49 \pm 5\%$ , 显著高于乙醇组的  $12 \pm 2\%$  和盐水组的  $10 \pm 4\%$  ( $P < 0.01$ ), 这与 FCM 的 DNA 分析显示 99- 克星组中 93% (13/14) 出现典型的亚二倍体的凋亡峰, 乙醇组仅 1 例出现低值的凋亡峰, 而盐水组无 1 例出现凋亡峰的结果相一致. 值得提出的是从 DNA 分析与 TUNEL 检测以及 Ki-67 抗原表达检测结果均显示乙醇组虽然肿瘤细胞生长也受抑制, 但并不表现为以凋亡为主的改变. 相反克星组 DNA 分析以及 TUNEL 检测结果均表明其抑制肿瘤生长的主要机制之一是诱导肝癌细胞凋亡, 二者有明显差别.

本结果表明复方中药 99- 克星具有强大的抑制与破坏肿瘤生长的作用. 除了能直接杀灭肿瘤细胞以及增强细胞免疫功能外, 还能抑制肝癌细胞的增生并且诱导肝癌细胞凋亡, 明显不同于无水乙醇, 尤其以抑制肝癌细胞的增生及诱导肝癌细胞凋亡的作用机制具有重要

意义, 因此其在肿瘤的治疗研究中具有重要的意义和良好的发展前景。

#### 4 参考文献

- Lin LW, Ye Z, Xue ES, Gao SD, He YM. A study of percutaneous hepatic quantified ethanol injection in treatment of hepatocarcinoma. *Zhongguo Chaosheng Yixue Zazhi* 2000;16:514-516
- Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, Makuuchi M, Nakamura Y, Okita K, Amada RY. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. The liver cancer study of Japan. *Hepatology* 2000;32:1224-1229
- Yamamoto J, Okada S, Shimada K, Okusaka T, Yamasaki S, Ueno H, Kosuge T. Treatment strategy for small hepatocellular carcinoma: Comparison of long-term results after percutaneous ethanol injection therapy and surgical resection. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):707-713
- Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:519-524
- Morimoto M, Sugimori K, Shirato K, Kokawa A, Tomita N, Saito T, Tanaka N, Nozawa A, Hara M, Sekihara H, Shimada H, Imada T, Tanaka K. Treatment of hepatocellular carcinoma with radiofrequency ablation: Radiologic-histologic correlation during follow-up periods. *Hepatology* 2002;35:1467-1475
- Kato T, Reddy KR. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: Help or hazard? *Hepatology* 2001;33:1336-1337
- Francica G. Complications of radio-frequency thermal ablation. *Radiology* 2001;220:554-554
- Goldberg SN. Comparison of techniques for image-guided ablation of focal liver tumors. *Radiology* 2002;223:304-307
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Llovet JM, Vilana R, Bru C, Bianchi L, Salmeron JM, Boix L, Ganau S, Sala M, Pagès M, Ayuso C, Solé M, Rodés J, Bruix J. Increased risk of tumor seeding after percutaneous radiofrequency ablation for single hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001;33:1124-1129
- Lin LW, He YM, Gao SD, Yan FD, Ye Z, Xie XD, Yu LY, Li XF, Yang YH. Percutaneous intratumoral injection of Chinese traditional medicine "Star-99" in treatment of hepatic carcinoma: an experimental study. *Zhonghua Chaosheng Yixue Zazhi* 2002;11:45-48
- Lin LW, He YM, Gao SD, Yang HD, Ye Z, Xie ES. Percutaneous intratumoral injection of compound chinese medicine in inducing the apoptosis of the hepatic cancer cell. *Zhongguo Yixue Yingxiang Jishu* 2002;18:6-8
- Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Ker G, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513-522
- Liu FS, Chen JT, Liu SC, Shih A, Shih RT, Ho ES. Expression and prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in malignant ovarian germ cell tumors. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 1999;62:695-702
- Setälä L, Kosma VM, Lippinen P, Naukkarinen A, Nordling S, Hollmén S, Eskelinen M, Syrjänen K, Alhava E. Clinical relevance of p53 index and expression of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1998;124:497-502
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13-20
- Kameyama K, Takami H, Umemura S, Osamura YR, Wada N, Sugino K, Mimura T, Ito K. PCNA and Ki-67 as prognostic markers in human parathyroid carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2000;7:301-304
- Nolte M, Werner M, Nasarek A, Bektas H, von Wasielewski R, Klemphauer J, Georgii A. Expression of proliferation associated antigens and detection of numerical chromosome aberrations in primary human liver tumors: relevance to tumour characteristics and prognosis. *J Clin Pathol* 1998;51:47-51
- Kodama T, Kawamoto K, Kono T, Shibuya Y, Setogawa T. Comparison of immunostainings for proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in human extraocular lesions. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997;235:767-772
- Bozlu M, Orhan D, Baltaci S, Yaman O, Elhan AH, Tulunay O, Muftuoglu YZ. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and nucleolar organizer region in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol* 2002;33:59-66
- Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 1999;59:1391-1399
- Ikeda M, Shomori K, Endo K, Makino T, Matsuura T, Ito H. Frequent occurrence of apoptosis is an early event in the oncogenesis of human gastric carcinoma. *Virchows Arch* 1998;432:43-47
- Li G, Tang L, Zhou X, Tron V, Ho V. Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. *Melanoma Res* 1998;8:17-23
- Chresta CM, Arriola EL, Hickman JA. Apoptosis and cancer chemotherapy. *Behring Inst Mitt* 1996;97:232-240
- Yamamoto M, Maehara Y, Oda S, Ichiyoshi Y, Kusumoto T, Sugimachi K. The p53 tumor suppressor gene in anticancer agent-induced apoptosis and chemosensitivity of human gastrointestinal cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43:43-49



# 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建

刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超

刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超, 湖北武汉大学中南医院普外科 湖北省武汉市 430071

刘志苏, 男, 1953-06-20 生, 湖北省罗田人, 汉族. 1977 年湖北医科大学临床医学系本科毕业, 1992 年华西医科大学博士研究生毕业, 主任医师、教授、博士研究生导师. 主要从事肝、胆、胰疾病的研究.

项目负责人: 刘志苏, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路 169 号, 湖北武汉大学中南医院普外科. hyfr@mail.wh.cei.gov.cn

电话: 027-87331752 传真: 027-87330795

收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

## Establishment of apoptotic model induced by hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma cell line BEL-7402

Zhi-Su Liu, Sheng-Li Tang, Zhong-Li Ai, Quan Sun, Qun Qian, Yue-Ming He, Zhong-Chao Zhu

Zhi-Su Liu, Sheng-Li Tang, Zhong-Li Ai, Quan Sun, Qun Qian, Yue-Ming He, Zhong-Chao Zhu, Department of General Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China.

Correspondence to: Zhi-Su Liu, Department of General Surgery, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China. hyfr@mail.wh.cei.gov.cn

Received: 2002-12-24 Accepted: 2003-01-08

## Abstract

**AIM:** To establish an apoptotic model induced by hydroxyapatite (HAP) nanoparticles in human hepatoma cell line *in vitro* in order to explore the mechanism of nanoparticles-induced apoptosis.

**METHODS:** The selected human hepatoma cell line BEL-7402 was treated with HAP nanoparticles at different concentrations and for various durations of time. Growth suppression was evaluated by MTT method. Apoptosis-related alterations in morphology and biochemistry were ascertained under cytochemical staining (Hoechst 33 258), transmission electron microscopy (TEM), and DNA agarose gel electrophoresis. Flow cytometry (FCM) was used to investigate the apoptotic rate.

**RESULTS:** HAP nanoparticles inhibited the growth of hepatoma cells in a dose and time-dependent manner. After BEL-7402 cells were treated with 50-200 mg/L HAP nanoparticles for 48 h, apoptosis with nuclear chromatin condensation and fragmentation as well as cell shrinkage were observed using fluorescent staining and TEM. DNA ladder could be demonstrated on DNA electrophoresis. By FCM analysis, the apoptotic rates at concentrations of 0 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L were 2.2 %, 20.3 %, 25.3 %, 29.8 %, 45.1 % and 53.1 %, respectively. Cell apoptosis began approximately at 12h after administration of 50 mg/L and peaked at 48 h following treatment. The rates at 12, 24, 36, and 48 h were 2.7 %, 3.5 %, 6.3 %, and 21.4 %, respectively.

**CONCLUSION:** HAP nanoparticles not only inhibit proliferation but also induce apoptosis of human hepatoma cell line BEL-7402 *in vitro*. The successful establishment of this model will help further explore the molecular mechanism of hepatoma cells apoptosis.

Liu ZS, Tang SL, Ai ZL, Sun Q, Qian Q, He YM, Zhu ZC. Establishment of apoptotic model induced by hydroxyapatite nanoparticles in human hepatoma cell line BEL-7402. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1357-1361

## 摘要

**目的:** 建立羟基磷灰石纳米粒子体外诱导人肝癌细胞凋亡的模型, 为进一步研究纳米粒子诱导肝癌细胞凋亡的分子机制奠定基础.

**方法:** 用羟基磷灰石纳米粒子以不同终浓度、不同时间作用于人肝癌 BEL-7402 细胞, 用细胞毒性实验(MTT 比色法)观察其细胞毒性, 倒置相差显微镜、荧光显微镜、透射电镜、DNA 琼脂糖凝胶电泳等方法观察凋亡在形态学和生化方面的变化. 流式细胞仪分析以进一步了解凋亡发生的时间和程度.

**结果:** 羟基磷灰石纳米粒子以剂量依赖和时间依赖的方式抑制 BEL-7402 细胞的生长. 50-200 mg/L 的纳米粒子处理 48 h 后, 形态学上, 肝癌细胞表现为细胞皱缩、核质浓缩、核碎裂、细胞起泡以及凋亡小体形成等凋亡特征. 琼脂糖凝胶电泳观察到 DNA “梯带”. 流式细胞仪定量分析, 0, 50、75、100、150、200 mg/L 浓度下调亡率分别为 2.2 %, 20.3 %, 25.3 %, 29.8 %, 45.1 % 和 53.1 %. 50 mg/L 作用 12 h 后肝癌细胞出现凋亡, 48 h 达高峰, 12, 24, 36, 48 h 细胞凋亡率分别为 2.7 %, 3.5 %, 6.3 % 和 21.4 %.

**结论:** 羟基磷灰石纳米粒子既能抑制人肝癌 BEL-7402 细胞增生, 又能诱导其凋亡, 该凋亡模型的成功建立将有助于进一步探讨纳米粒子诱导肝癌细胞凋亡的分子机制.

刘志苏, 唐胜利, 艾中立, 孙权, 钱群, 何跃明, 朱忠超. 羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌细胞凋亡模型的构建. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1357-1361  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1357.asp>

## 0 引言

纳米技术 1990 年代取得了突破性进展, 其在医学领域的应用开创了纳米医学研究的新篇章. 羟基磷灰石纳米粒子(hydroxyapatite nanoparticles)是随之发展起来的一种新型纳米材料. 已有研究发现其对癌细胞的生长有抑制

作用,且抗瘤谱广,但在诱导癌细胞凋亡方面国内外尚未见报道.我们从羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的角度探讨其抑制癌细胞生长的机制,为纳米材料用于临床提供理论依据和实验依据.

## 1 材料和方法

1.1 材料 羟基磷灰石纳米粒子由华东理工大学生物材料中心提供,用培养液配制成浓度 400 mg/L 的溶胶,0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌备用; RNase 酶、蛋白酶 K、碘化丙啶(PI)及 Hoechst 32258 荧光染色剂购于 Sigma 公司; RPMI1640 培养基、小牛血清、MTT 购自 Gibco 公司; MODEL2300 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, Shellab 公司; BH-2 型荧光显微镜, Olympus 公司; Hitachi-600 型透射电镜,日立公司; FACSort 流式细胞仪, Becton Dickinson 公司. 人肝癌细胞系 BEL-7402, 武汉大学中国典型培养物保藏中心(CCTCC)提供,培养于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 37  $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱内常规传代培养. 细胞贴壁生长 24 h, 至 70-80% 单层后更换含药培养基进行实验.

1.2 方法 细胞毒性实验(MTT 比色法)参考(Hussain J Immunol Methods 1993; 160: 89)方法,取密度为  $2 \times 10^5$ /L 的细胞接种于 96 孔培养板中每孔 200  $\mu$ L, 培养 24 h 后,弃原培养液,加含不同浓度药物的新培养液,各为 200, 50, 12.5 mg/L 及对照(0 mg/L),每浓度设 8 个复孔,分别作用 24, 48, 72 h 后,加入新配制的 MTT 液每孔 20  $\mu$ L,置 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱内培养作用 4h,小心吸去上清液,加入二甲亚砜(DMSO) 150  $\mu$ L,在振荡器上轻轻振荡 5 min 后,用酶标仪于 490 nm 处测吸光度值(A 值).取 8 孔平均值,计算抑制率.根据公式:细胞抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)  $\times$  100%,以横坐标为时间,纵坐标为抑制率,绘制细胞生长抑制曲线.预定时间倒置相差显微镜观察不同浓度作用的细胞的生长情况.收集 200, 150, 100, 75, 50, 0 mg/L (对照)药物作用 48 h 后的肝癌细胞,离心, PBS 缓冲液洗涤, 3:1 甲醇/冰醋酸固定液固定 10 min,再离心,留取少量固定液悬浮细胞;于盖玻片上用荧光染液 Hoechst33258 染色 45 min;将有细胞一面的盖玻片封盖在预滴封片液的载玻片上,自然晾干,在 BH-2 荧光显微镜下观察并摄影.收集接种于 T-25 培养瓶内,经 100 mg/L 药物处理 48 h 后的细胞, 30 g/L 戊二醛固定,再用 10 g/L 锇酸固定,逐级酒精脱水,氧化丙烯浸透,树脂包埋,超薄切片机切片,于透射电子显微镜下观察并摄影.细胞溶解于裂解缓冲液 400  $\mu$ L 中, 4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清,加蛋白酶 K 及 RNase 置 50  $^{\circ}$ C 孵育 2 h.再加入 NaCl 及同体积异丙醇 -20  $^{\circ}$ C 过夜,离心去上清,700 mL/L 乙醇溶解沉淀,离心后空气干燥.加 TE 9  $\mu$ L 和载样缓冲液 1  $\mu$ L, 15 g/L 琼脂糖凝胶, 35 V 电压,电泳 2 h.紫外灯下观察并摄影.收集经羟基磷灰石纳米粒子(0, 50, 75, 100, 150, 200 mg/L)处理 48 h 和

50 mg/L 浓度处理 12, 24, 36, 48 h 的细胞,用胰酶消化制成单细胞悬液,离心弃上清,沿管壁缓慢加入 700 mL/L 预冷(-20  $^{\circ}$ C)乙醇 1 mL 固定,(注意边加边振荡,以免细胞成团),4  $^{\circ}$ C 过夜后再经 PBS 洗 2 次,100  $\mu$ L RNA 酶(100 mg/L)消化, 37  $^{\circ}$ C 30 min,再加入 50 mg/L PI 染色液 100  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C 避光 30 min 后上机测试,采用 FACSort 流式细胞仪对样品进行检测,每次计细胞数 6 000 个,激发波长 488 nm,分析软件 CellQuest 计算凋亡率.

统计学处理 所有实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,实验组与对照组比较行 t 检验.

## 2 结果

2.1 羟基磷灰石纳米粒子对细胞生长的影响 MTT 检测结果显示纳米粒子对肝癌细胞的抑制率均随着剂量的增大和作用时间的延长而增强,同时间不同浓度组与其对照组比较均有极显著性差异(表 1).

表 1 羟基磷灰石纳米粒子对 BEL-7402 细胞生长的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , A<sub>490nm</sub>, n=8)

t/h	浓度 (mg/L)			
	0	12.5	50	200
24	0.721 $\pm$ 0.041	0.536 $\pm$ 0.035	0.485 $\pm$ 0.036 <sup>b</sup>	0.425 $\pm$ 0.030 <sup>b</sup>
48	0.933 $\pm$ 0.035	0.501 $\pm$ 0.088 <sup>b</sup>	0.395 $\pm$ 0.040 <sup>b</sup>	0.259 $\pm$ 0.027 <sup>b</sup>
72	0.973 $\pm$ 0.021	0.438 $\pm$ 0.040 <sup>b</sup>	0.345 $\pm$ 0.035 <sup>b</sup>	0.201 $\pm$ 0.031 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 0 mg/L.

2.2 显微镜观察 倒置相差显微镜下见对照组肝癌细胞贴壁生长,核膜、核仁轮廓明显,核糖体颗粒丰富胞质饱满,相邻细胞生长融合成片;经 HAP 处理的各组细胞,24 h 后观察见细胞逐渐由贴壁而脱落,48 h 脱落更明显,脱落细胞悬浮于培养液中,细胞形态变圆,折光性差,生长增生明显受抑.细胞经 Hoechst 33258 染色后,荧光显微镜下见对照组 BEL-7402 细胞胞膜完整,胞质丰富,核形态饱满,表现为弥散均匀的蓝色荧光.而处理组可见核体积缩小,荧光染色增强,染色质呈致密浓染的块状或颗粒状荧光以及凋亡小体形成,呈现典型的凋亡形态特征.而且随浓度增加凋亡细胞增多(图 2).镜下计算各浓度组凋亡率,50, 75, 100, 150, 200 mg/L 分别为 18.7%、22.3%、33.5%、49.0% 和 57.2%.透射电镜观察下对照组细胞胞质密度高,细胞器正常,染色质均匀分散、密度一致,核膜完整,核仁大且完整(图 3 A);而经羟基磷灰石纳米粒子处理的细胞发生皱缩,胞质空泡形成,细胞核固缩、染色质凝集、染色质聚集于核膜周边形成数个团块或境界分明的新月形小体(图 3 B).

2.3 琼脂糖凝胶电泳 不同浓度羟基磷灰石纳米粒子作用 48 h 后,对照组仅显示基因组,当浓度为 100 mg/L, 200 mg/L 时出现典型的梯状带.

2.4 流式细胞仪检测 DNA直方图上可见亚二倍体峰(即AP峰apoptotic peak), 此一低DNA含量的亚二倍体峰的百分比, 即为细胞的凋亡率(图4)。0、50、75、100、150、200 mg/L 羟基磷灰石纳米粒子作用48 h后的细胞凋亡率分别为2.2%, 20.3%, 25.3%, 29.8%, 45.1%和53.1%。相关分析示二者呈高度正相关( $r=0.994$ ,  $P<0.01$ ); 回归方程为  $y_{\text{凋亡率}}=0.0842+0.0023 \times \text{浓度}$ , 计算得半数有效凋亡浓度  $EC_{50}=181.82 \text{ mg/L}$ 。50 mg/L 作用12, 24, 36, 48 h 凋亡率为2.7%, 3.5%, 6.3%和21.4%。

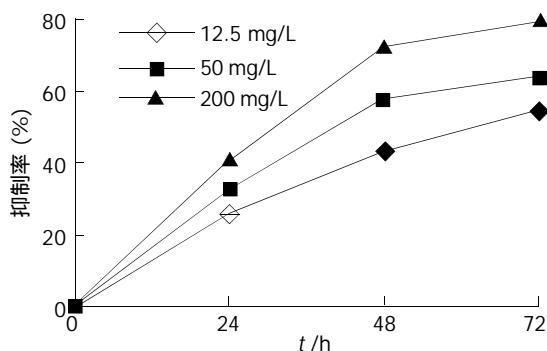


图1 不同浓度羟基磷灰石纳米粒子和作用时间对BEL-7402细胞的生长抑制作用。

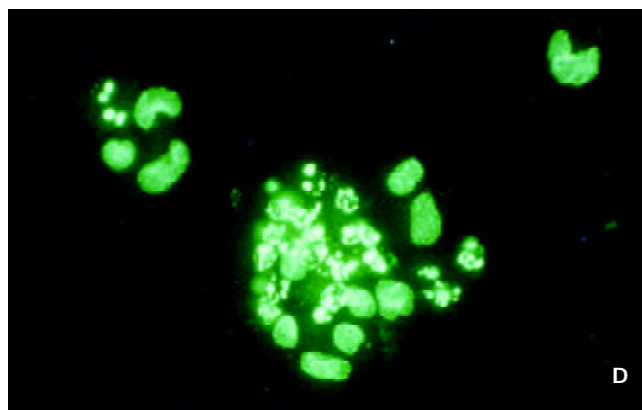
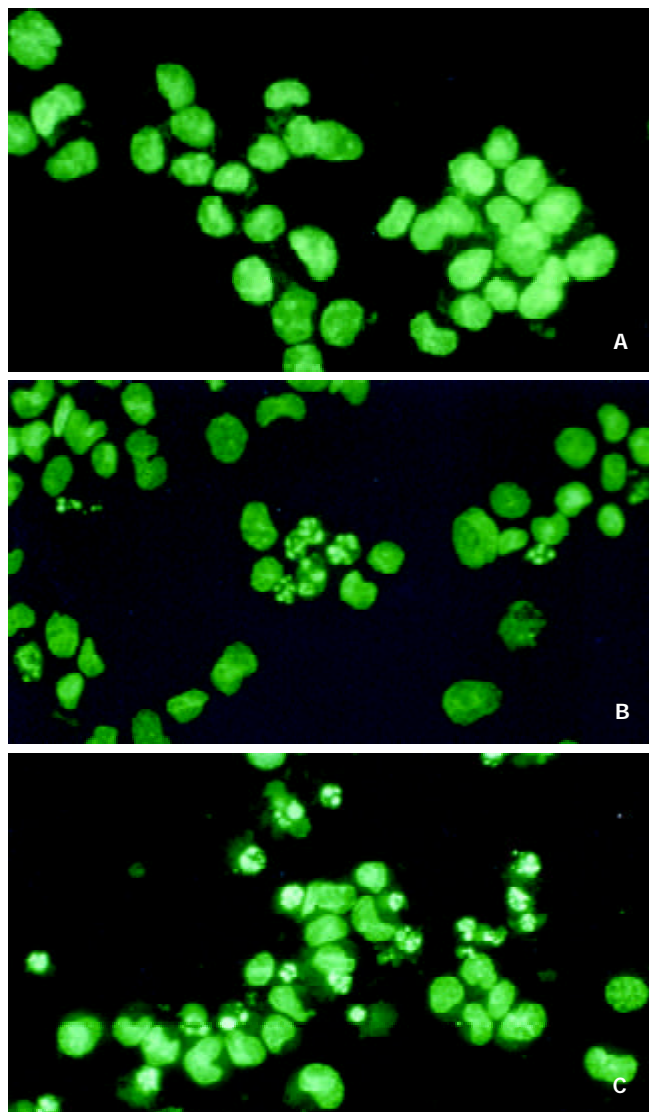
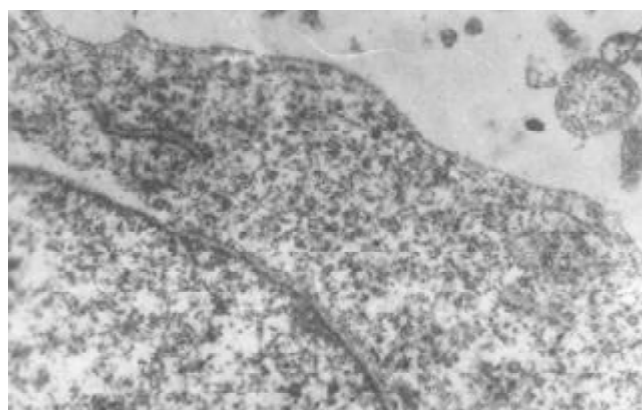
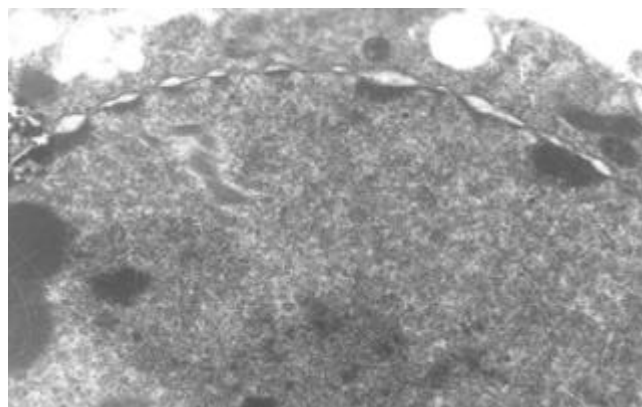


图2 HAP 纳米粒子作用48h后BEL-7402细胞凋亡的荧光显微镜检查  $\times 200$ 。  
A 对照组; B 50 mg/L; C 100 mg/L; D 200 mg/L。

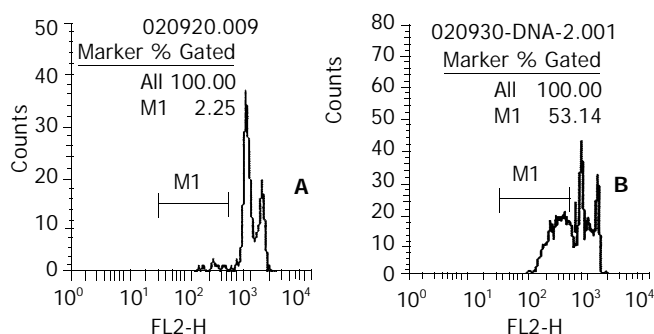


A 对照组;



B 100 mg/L.

图3 HAP 纳米粒子作用48 h后BEL-7402细胞凋亡的透射电镜检查  $\times 15000$ 。



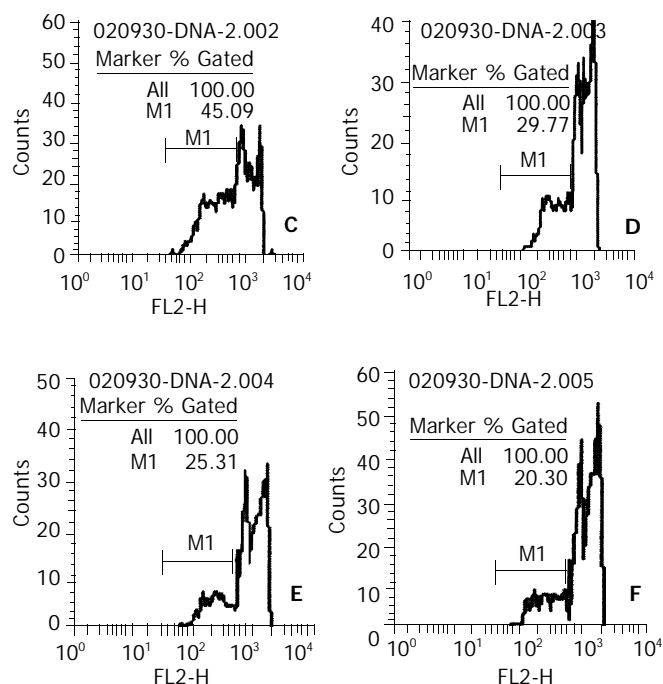


图4 HAP纳米粒子作用48 h后BEL-7402细胞凋亡的流式细胞术分析。A 对照组; B 50 mg/L; C 75 mg/L; D 100 mg/L; E 150 mg/L; F 200 mg/L。凋亡率分别为2.2 %; 20.3 %; 25.3 %; 29.8 %; 45.1 %; 53.1 %。

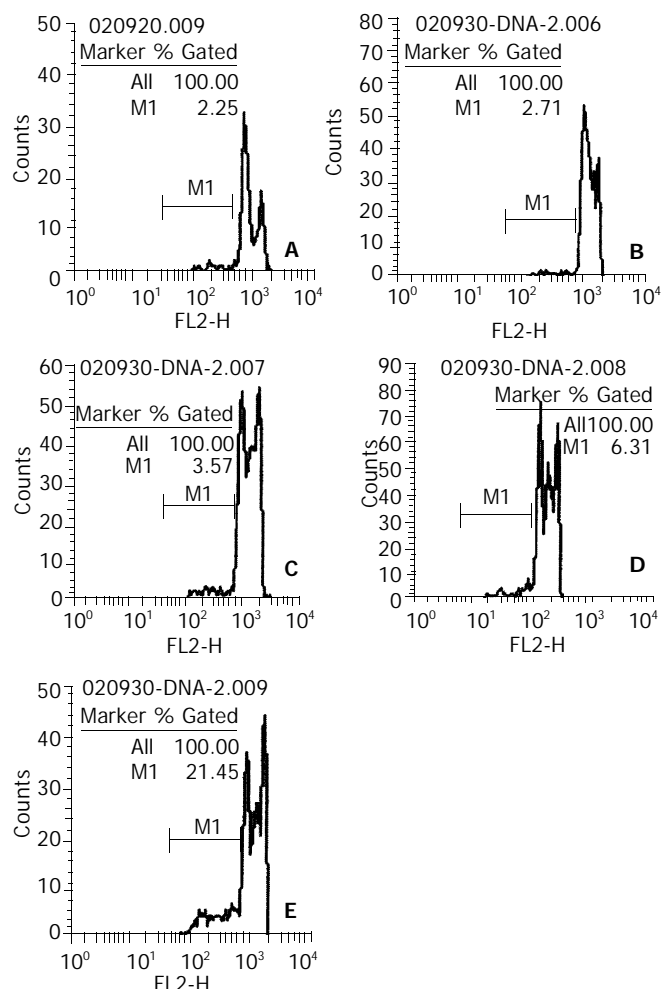


图5 50 mg/L HAP纳米粒子作用不同时间后BEL-7402细胞凋亡的流式细胞术分析。A 对照组; B 12 h; C 24 h; D 36 h; E 48 h。凋亡率分别为2.2 %; 2.7 %; 3.6 %; 6.3 %; 21.4 %。

### 3 讨论

肿瘤的发生和发展不仅与细胞的分化异常及增生过度有关,而且与其细胞凋亡的减少密切相关<sup>[1-8]</sup>。而一旦细胞增生与凋亡失控,则可导致肿瘤的发生<sup>[9-25]</sup>。因此,开发诱导肿瘤细胞凋亡的新药,成为肿瘤治疗的新方向。迄今为止,已证实化疗药物、生长抑素类似物、砷剂及多种中药成分<sup>[26-37]</sup>都能以诱导细胞凋亡的方式抑制肿瘤细胞生长。羟基磷灰石[Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>]简称HAP是人类骨无机组成的主要成分,有很好的组织相容性及黏附性,其粉末用作骨缺损部位的填补材料已被广泛应用于临床。本研究用羟基磷灰石纳米粒子由溶胶-凝胶法合成,其粒径为50 nm左右,介于0.1-100 nm(纳米级范围)间,表现出纳米粒子所独有的小尺寸效应,表面与界面效应,量子尺寸效应,宏观量子隧道效应,具有高溶解度,高表面能,强的离子交换能力,强极化力等特性。作用于体外培养的人肝癌BEL-7402细胞后,MTT毒性实验显示其对肝癌细胞的生长增生具有较强的抑制作用,呈明显的剂量效应和时间效应关系。低浓度时即有明显的抑制作用,高浓度时此作用更强;24 h时细胞抑制率都未达到50%,48 h时是BEL-7402细胞对羟基磷灰石纳米粒子作用较敏感的时期,抑制率升高非常明显,作用72 h抑制率继续升高,但增幅并不大。这一结果与文献报道羟基磷灰石溶胶(HAP Sol)对W-256癌肉瘤细胞和艾氏腹水瘤细胞作用24 h后,半数有效抑制浓度分别为189 mg/L和210 mg/L相当。MTT毒性实验结果有助于指导羟基磷灰石纳米粒子的实际应用,便于选择合适的浓度和作用时间。

倒置相差显微镜亦显示羟基磷灰石纳米粒子作用后,肝癌细胞贴壁能力下降,细胞悬浮于培养液中,浓度越高,作用时间越长,悬浮细胞越多,与MTT毒性实验结果相一致。荧光显微镜和透射电镜示细胞凋亡形态学上的变化,可见细胞体积缩小,胞膜皱缩,核固缩,核质沿核膜浓缩边集,形成数个团块或境界分明的新月形小体,有的细胞核碎裂,形成由膜状物包裹内容物凋亡小体。琼脂糖凝胶电泳显示DNA梯状带型,呈细胞凋亡典型的生化改变,并且浓度越高,梯状带型越明显。

FCM分析则定量检测细胞凋亡,其结果与MTT法所示剂量依赖效应和时间依赖效应相一致。不同浓度作用48 h后细胞凋亡率与荧光显微镜下计数结果相符合,相关分析示细胞凋亡率与浓度呈高度正相关;回归分析得半数有效凋亡浓度EC<sub>50</sub>=181.82 mg/L,而在MTT毒性实验中,同一浓度作用48 h后的细胞抑制率接近70%。此结果表明羟基磷灰石纳米粒子对人肝癌BEL-7402细胞的抑制作用中,诱导细胞凋亡占主要作用。纵观不同浓度的细胞抑制率和凋亡率,纳米粒子浓度越高,诱导细胞凋亡作用越强。浓度为50 mg/L的纳米粒子作用不同时间后,36 h凋亡率都较低,小于10%,48 h增至21.64%,说明48 h后羟基磷灰石纳米粒子对BEL-7402细胞的凋亡诱导作用可达到高峰。因此实际



应用中作用时间应以 48 h 或更长时间为宜, 以达到较好的凋亡诱导率。

总之, 本实验结果表明在体外羟基磷灰石纳米粒子能以诱导细胞凋亡的方式抑制肝癌细胞的生长。该凋亡模型的成功建立, 为进一步探讨细胞凋亡发生的机制奠定了基础。

#### 4 参考文献

- He SW, Shen KQ, He YJ, Xie B, Zhao YM. Regulatory effect and mechanism of gastrin and its antagonists on colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:408-416
- Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454
- Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002;8:446-450
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003;88:902-909
- Shigeno M, Nakao K, Ichikawa T, Suzuki K, Kawakami A, Abiru S, Miyazoe S, Nakagawa Y, Ishikawa H, Hamasaki K, Nakata K, Ishii N, Eguchi K. Interferon-alpha sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and NF-kappaB inactivation. *Oncogene* 2003;22:1653-1662
- Perez EA, Gandara DR, Edelman MJ, O'Donnell R, Lauder II, DeGregorio M. Phase I trial of high-dose tamoxifen in combination with cisplatin in patients with lung cancer and other advanced malignancies. *Cancer Invest* 2003;21:1-6
- Lin HL, Lui WY, Liu TY, Chi CW. Reversal of Taxol resistance in hepatoma by cyclosporin A: involvement of the PI-3 kinase-AKT 1 pathway. *Br J Cancer* 2003;88:973-980
- Yamashita H, Iwase H, Toyama T, Fujii Y. Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer cells. *Oncogene* 2003;22:1638-1652
- Shen ZY, Shen J, Li QS, Chen CY, Chen JY, Yi Z. Morphological and functional changes of mitochondria in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenic trioxide. *World J Gastroenterol* 2002;8: 31-35
- Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Cai WJ, Yi Z. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite. *World J Gastroenterol* 2002;8:40-43
- Sun ZJ, Pan CE, Liu HS, Wang GJ. Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:79-81
- Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7: 796-800
- Li J, Yang XK, Yu XX, Ge ML, Wang WL, Zhang J, Hou YD. Overexpression of p27 (KIP1) induced cell cycle arrest in G (1) phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6:513-521
- Chen YN, Chen JC, Yin SC, Wang GS, Tsauer W, Hsu SF, Hsu SL. Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. *Int J Cancer* 2002;100:158-165
- Sun BH, Zhao XP, Wang BJ, Yang DL, Hao LJ. FADD and TRADD expression and apoptosis in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6:223-227
- Pals DR, Thompson CB. Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:75-78
- Shan CM, Li J. Study of apoptosis in human liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:247-252
- Misawa M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Abe K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *Int J Oncol* 2002;21:1087-1092
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol* 2003;22:107-113
- Satomi D, Takiguchi N, Koda K, Oda K, Suzuki H, Yasutomi J, Ishikura H, Miyazaki M. Apoptosis and apoptosis-associated gene products related to the response to neoadjuvant chemotherapy for gastric cancer. *Int J Oncol* 2002;20:1167-1171
- Tu SP, Zhong J, Tan JH, Jiang XH, Qiao MM, Wu YX, Jiang SH. Induction of apoptosis by arsenic trioxide and hydroxy camptothecin in gastric cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:532-539
- Zhao AG, Zhao HL, Jin XJ, Yang JK, Tang LD. Effects of Chinese Jianpi herbs on cell apoptosis and related gene expression in human gastric cancer grafted onto nude mice. *World J Gastroenterol* 2002;8:792-796
- Li JM, Zhou H, Cai Q, Xiao GX. Role of mitochondrial dysfunction in hydrogen peroxide-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:562-567
- Ma L, Tai H, Li C, Zhang Y, Wang ZH, Ji WZ. Photodynamic inhibitory effects of three perylenequinones on human colorectal carcinoma cell line and primate embryonic stem cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:485-490
- Zhang JK, Li J, Zhang J, Chen HB, Chen SB. Antitumor immunopreventive and immunotherapeutic effect in mice induced by hybrid vaccine of dendritic cells and hepatocarcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2003;9:479-484
- Li QF, Ou-Yang GL, Peng XX, Hong SG. Effects of tachyplesin on the regulation of cell cycle in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:454-458
- Zhou HB, Zhu JR. Paclitaxel induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:442-445
- Zhou HB, Yan Y, Sun YN, Zhu JR. Resveratrol induces apoptosis in human esophageal carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:408-411
- Liu WB, Yang CQ, Jiang W, Wang YQ, Guo JS, He BM, Wang JY. Inhibition on the production of collagen type I, III of activated hepatic stellate cells by antisense TIMP-1 recombinant plasmid. *World J Gastroenterol* 2003;9:316-319
- Huang ZH, Fan YF, Xia H, Feng HM, Tang FX. Effects of TNP-470 on proliferation and apoptosis in human colon cancer xenografts in nude mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:281-283
- Wu BW, Wu Y, Wang JL, Lin JS, Yuan SY, Li A, Cui WR. Study on the mechanism of epidermal growth factor-induced proliferation of hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:271-275
- Chen C, Liu FK, Qi XP, Li JS. The study of chemiluminescence in gastric and colonic carcinoma cell lines treated by anti-tumor drugs. *World J Gastroenterol* 2003;9:242-245
- Xie DP, Chen LB, Liu CY, Liu JZ, Liu KJ. Effect of oxytocin on contraction of rabbit proximal colon in vitro. *World J Gastroenterol* 2003;9:165-168
- Shi M, Wang FS, Wu ZZ. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes on hepatocellular carcinoma cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003; 9:73-78
- Liu JW, Tang Y, Shen Y, Zhong XY. Synergistic effect of cell differential agent-II and arsenic trioxide on induction of cell cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:65-68

# $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 在肝癌肝内转移中的作用

苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 石 明

苏小康, 赵先明, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 广州中医药大学第一附属医院三外科 广东省广州市 510405  
李锦清, 石明, 中山大学肿瘤医院肝胆科 广东省广州市 510060  
苏小康, 男, 1969-07-25 生, 陕西省商州市人, 汉族. 博士后, 讲师.  
项目负责人: 苏小康, 510405, 广东省广州市机场路 16 号, 广州中医药大学第一附属医院三外科. suxibo@yeah.net  
电话: 020-36591843 传真: 020-36590540  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-29

## Role of $\beta$ -catenin and cyclin D1 expressions in intrahepatic dissemination of liver cancer

Xiao-Kang Su, Xian-Ming Zhao, Jin-Qing Li, Xue-Jiao Cui, Xiao-Hua Xie, Hai-Yan Yang, Fa-Bing Xu, Ming Shi

Xiao-Kang Su, Xian-Ming Zhao, Xue-Jiao Cui, Xiao-Hua Xie, Hai-Yan Yang, Fa-Bing Xu, Third Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Guangzhou Traditional Chinese Medical University, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Jin-Qing Li, Ming Shi, Department of Hepatobiliary Surgery, Cancer Hospital, Zhongshan University, Guangzhou 510060, Guangzhou Province, China  
Correspondence to: Xiao-Kang Su, Third Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Guangzhou Traditional Chinese Medical University, 16 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangzhou Province, China. suxibo@yeah.net  
Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-29

## Abstract

**AIM:** To analyze the relationship between expressions of  $\beta$ -catenin and cyclin D1 and formation of portal vein tumor thrombus and clinical pathologic parameters.

**METHODS:**  $\beta$ -catenin and Cyclin D1 were tested in primary liver cancer, tumor thrombus and paracancer tissue in 32 cases of hepatic carcinoma with immunohistochemistry. Their effect on clinic pathologic parameters was also discussed.

**RESULTS:** The positive rates of  $\beta$ -catenin expression in primary liver cancer, tumor thrombus and paracancer tissue were 62.5 %, 81.25 %, and 9.38 %, respectively. The positive rates of  $\beta$ -catenin expression were also correlated with tumor thrombus, HBV infection and liver cirrhosis. The positive rates of cyclin D1 expression in primary liver cancer, tumor thrombus and paracancer tissue were 46.9 %, 75 %, and 18.8 %, respectively. It was also correlated with tumor thrombus, cell classification and differentiation. There were obvious differences among three groups in expression of  $\beta$ -catenin and cyclin D1.

**CONCLUSION:**  $\beta$ -catenin and cyclin D1 are helpful for initiation and progression of tumor thrombus and play an important role in the course of liver cirrhosis and HBV infection. Cyclin D1 influences tumor classification and

differentiation.

Su XK, Zhao XM, Li JQ, Cui XJ, Xie XH, Yang HY, Xu FB, Shi M. Role of  $\beta$ -catenin and cyclin D1 expressions in intrahepatic dissemination of liver cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1362-1364

## 摘要

**目的:** 探讨  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 与癌栓形成及临床病理参数的关系.

**方法:** 用免疫组化法检测 32 例肝癌原发灶、癌栓和癌旁组织中  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 的表达, 同时分析其与临床病理参数之间的关系.

**结果:**  $\beta$ -catenin 在原发灶、癌栓和癌旁组织中的阳性率分别为 62.5 %、81.25 %、9.38 %, 三者之间有显著差别;  $\beta$ -catenin 与癌栓形成、HBV 感染、肝硬化有关. Cyclin D1 在原发灶、癌栓和癌旁组织中的阳性率分别为 46.9 %、75 %、18.8 %, 三者之间有显著差别; Cyclin D1 与癌栓形成、组织类型、分化程度有关.

**结论:**  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 促进癌栓形成, 参与 HBV 感染和肝硬化形成过程; Cyclin D1 影响肿瘤组织类型和分化程度.

苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬, 石明.  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 在肝癌肝内转移中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(9): 1362 - 1364

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1362.asp>

## 0 引言

$\beta$ -catenin 不仅在钙粘蛋白(E-CD)介导的细胞黏附、细胞分化、细胞骨架中起重要作用, 而且是 WNT 信号传导通道的关键环节, 调控 Cyclin D1 及 C-myc 等原癌因的表达. Cyclin D1 能与细胞周期蛋白激酶(CDK4)结合, 激活的 CDK4- Cyclin D1, 复合物可以与多种蛋白协同作用促进细胞由 G1 期向 S 期的过度, 我们检测了  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 蛋白在肝癌组织、门脉癌栓及癌旁组织中的表达, 探讨了  $\beta$ -catenin 和 Cyclin D1 与肝癌肝内播散和临床病理参数之间的关系, 现报告如下

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2000-07/2001-05 中山大学肿瘤医院肝胆外科手术切除原发性肝癌标本, 同时取肿瘤边缘 2 cm 外肝组织作癌旁组织, 男 25 例, 女 7 例, 年龄 26-64,

(中位 45 岁). 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5  $\mu$ m 连续切片. 根据 Enmondson 病理标准分为 I、II、III、IV 4 级.  $\beta$ -catenin、Cyclin D1 鼠抗人购自广州康润生物制品公司, SP 试剂盒购自美国 Vector 公司.

1.2 方法 免疫组化操作步骤按试剂盒说明操作, 并根据情况稍加改进, 两种方法均需微波抗原修复. 用试剂携带阳性片作为阳性对照, PBS 液作为一抗作为阴性对照. 将阳性细胞按其数量及染色强度分为 3 级. 表达弱阳性(+): 细胞数量 <10 %, 染色强度弱阳性或仅个别细胞中至强阳性; 表达强阳性(+++): 阳性细胞数 >60 %, 中至强阳性染色, 少数可为弱阳性表达; 中度阳性(++): 阳性细胞数在 10-60 % 之间; 无表达(-): Cyclin D1 染色强度与背景基本无差别,  $\beta$ -catenin 为细胞膜轻度染色.

统计学处理 用 SPSS10.0 行 FISHER 精确  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

2.1  $\beta$ -catenin 的表达 癌旁组织中  $\beta$ -catenin 均匀分布于细胞膜, 仅极个别标本中有胞质极弱着色, 细胞核无染色, 而在原发灶 62.5 % (20/32), 癌栓 81.25 % (26/32) 中出现在细胞质或核内沉积. 门静脉癌栓明显高于原发灶 ( $P < 0.04$ ), 而在无门脉癌栓者原发灶中表达强度明显低于有转移灶者 (表 1).

表 1 HCC、癌栓、癌旁组织中  $\beta$ -catenin 和 cyclin D1 蛋白的表达 ( $n = 32$ )

HCC	$\beta$ -catenin				cyclin D1			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
原发灶	12	9	7	4	17	6	5	4
癌栓	6	6	9 <sup>a</sup>	11	8	4	8	12 <sup>a</sup>
癌旁	29	2	1	0	26	4	2	0

<sup>a</sup> $P < 0.05$ .

表 2  $\beta$ -catenin、cyclin D1 与临床病理参数之间的关系

参数	$\beta$ -catenin		cyclin D1	
	N	A	N	A
HBV +	7	14	10	9
-	5	6 <sup>a</sup>	7	6
肝硬化 轻	7	16	9	9
重	5	4 <sup>a</sup>	8	6
肿瘤大小 小于 5 cm	6	12	10	10
大于 5 cm	6	8	7	5
包膜 完整	7	11	9	8
不完整	5	9	8	7
癌栓 有	3	15	4	13
无	9	5 <sup>a</sup>	13	2 <sup>a</sup>
组织类型 HCC	6	9	5	10
CC	6	11	12	5 <sup>a</sup>
混合型	1	1	0	0
分化程度 I	4	6	4	6
II	6	10	9	7 <sup>a</sup>
III	2	4	4	2

N: 细胞核 A: 细胞质 <sup>a</sup> $P < 0.05$

2.2 Cyclin D1 的表达 Cyclin D1 阳性染色有二种类型: 细胞核型: 定位于细胞核中, 细胞质型: 分布于细胞质中, 阳性细胞染色呈弥漫状分布. 肝癌原发灶中 46.9 % 呈阳性表达, 癌栓中阳性率则高达 75.0 %, 而癌旁组织中明显低, 仅 18.8 %, 在三组间有明显差异, 依次为癌栓、原发性、癌旁 (表 1).

2.3  $\beta$ -Catenin, Cyclin D1 与临床病理参数之间的关系  $\beta$ -Catenin 的异常表达与 HBV 感染、肝硬化和癌栓形成有关, 而与肿瘤大小、包膜、组织类型和分化程度无关. Cyclin D1 在癌栓形成、组织类型和分化中有差异, 而在 HBV 感染, 肝硬化, 肿瘤大小、包膜中无差异 (表 2).

## 3 讨论

门静脉癌栓是原发性肝癌肝内转移的主要方式, 也是引起肝癌术后复发的重要原因 (术后复发率高达 60.8 %), 严重影响临床疗效<sup>[1, 2]</sup>.  $\beta$ -Catenin 在细胞黏附和 WNT 信号传导两个过程发挥作用, c-myc 和 Cyclin D1 是 WNT 通路中的核心环节<sup>[3, 4]</sup>, 无功能的  $\beta$ -Catenin 在细胞过度沉积导致细胞内游离  $\beta$ -Catenin 水平升高, 细胞过度增生<sup>[5, 6]</sup>. 我们发现在转移灶中有  $\beta$ -Catenin 异常表达, 而且在癌栓中明显高于原发灶和癌旁组织, 参与癌栓形成过程中多个环节: 黏附松散, 脱离复发灶, 到达转移部位的增生和黏附两方面发挥作用, 通过两个途径促进肝内播散. Cyclin D1 编码基因位于 11q3<sup>[7, 8]</sup>, 我们发现原发灶, 癌栓和癌旁组织中表达不同, 癌栓中明显高于原发灶和癌旁组织. 提示 Cyclin D1 在原发灶形成和肿瘤细胞转移到门脉内继续增生都有促进作用.

$\beta$ -Catenin 作为 WNT 通路中的关键环节, 并非单一上下游的线性运行<sup>[9-11]</sup>, 与其他信号通道可能相互影响, 从而形成复杂的网络效应, Gleason et al<sup>[12]</sup> 人发现 WNT-1, Notch 信号通路 G 蛋白通路之间有相互作用, 提示  $\beta$ -Catenin 异常表达在肿瘤发展过程中有多重效应<sup>[13-15]</sup>. 本研究发现 HBV 感染肝硬化以及门脉癌栓形成与  $\beta$ -Catenin 的异常表达密不可分, 可能在 HBV 感染或 HBX 基因插入诱导肝细胞恶变过程, 肝脏损伤纤维化修复过程中有  $\beta$ -Catenin 或其信号传导机制的异常. 但是本研究发现  $\beta$ -Catenin 对肿瘤大小, 包膜, 组织类型及分化程度的影响不大. Cyclin D1 是一种弱致癌基因, 与其他癌基因关系密切<sup>[16-18]</sup>, 在一些细胞种 Cyclin D1 本身并无转化作用<sup>[19-21]</sup>. 但能与 ras 基因协同转化大鼠成纤维细胞<sup>[22-24]</sup>. 野生型 P53 蛋白的积聚可引起 Cyclin D1 表达增加, Cyclin D1 基因扩增和 P53 突变是正相关, 因而 cyclin D1 异常表达进一步影响肿瘤临床病理参数<sup>[25, 26]</sup>, Cyclin D1 表达与乳腺癌组织类型有关<sup>[27]</sup>. 在胰腺癌研究中, 发现 Cyclin D1 表达与年龄、分化程度、分期大小、部位、淋巴结转移无关, 但 Cyclin D1 阴性者生存期明显短<sup>[28, 29]</sup>, 本组资料中组织类型、分化程度、癌栓形成与 Cyclin D1 异常表达有关, 可能是 Cyclin D1

与其他癌基因协同作用的结果。Qin et al<sup>[30]</sup>也发现肝癌中有 Cyclin D1 基因扩增或过度表达, 而且影响临床病理参数。

本结果显示 $\beta$ -Catenin和Cyclin D1蛋白表达与肝癌肝内播散有关, 促进门静脉癌栓形成, 与部分临床病理参数密切相关, 通过WNT信号通路及细胞周期途径影响肝癌的发展, 针对上述环节的分子生物学治疗可能会阻止门脉癌栓的形成, 可以作为开展分子生物学治疗的靶点。但体内信号传递网络的复杂性和细胞周期调控的精确机制不是 $\beta$ -Catenin和Cyclin D1能完全解释的, 对信号传递和细胞周期调控的进一步研究可能会给肝癌转移的治疗带来突破性的进展。

#### 4 参考文献

- Belghiti J, Regimbeau JM, Durand F, Kianmanesh AR, Dondero F, Terris B, Sauvanet A, Farges O, Degos F. Resection of hepatocellular carcinoma: a European experience on 328 cases. *Hepatogastroenterology* 2002;49:41-46
- Kew MC. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002;181-182:35-38
- Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:280-287
- Monga SP, Monga HK, Tan X, Mule K, Padiaditakis P, Michalopoulos GK. Beta-catenin antisense studies in embryonic liver cultures: role in proliferation, apoptosis, and lineage specification. *Gastroenterology* 2003;124:202-216
- Cui J, Zhou XD, Liu YK, Tang ZY, Zile MH. Abnormal beta-catenin gene expression with invasiveness of primary hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol* 2001;7:542-546
- Jiang Y, Zhou XD, Liu YK, Wu X, Huang XW. Association of hTcf-4 gene expression and mutation with clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:804-807
- Li QF, Ou-Yang GL, Peng XX, Hong SG. Effects of tachyplesin on the regulation of cell cycle in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:454-458
- Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver* 2001;21:89-95
- Ebert MP, Yu J, Hoffmann J, Rocco A, Rocken C, Kahmann S, Muller O, Korc M, Sung JJ, Malfertheiner P. Loss of Beta-catenin expression in metastatic gastric cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:1708-1714
- Lowy AM, Fenoglio-Preiser C, Kim OJ, Kordich J, Gomez A, Knight J, James L, Groden J. Dysregulation of beta-catenin expression correlates with tumor differentiation in pancreatic duct adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2003;10:284-290
- Miyoshi K, Hennighausen L. beta-Catenin: a transforming actor on many stages. *Breast Cancer Res* 2003;5:63-68
- Gleason JE, Korswagen HC, Eisenmann DM. Activation of Wnt signaling bypasses the requirement for RTK/Ras signaling during *C. elegans* vulval induction. *Genes Dev* 2002;16:1281-1290
- Tsukashita S, Kushima R, Bamba M, Nakamura E, Mukaisho K, Sugihara H, Hattori T. Beta-catenin expression in intramucosal neoplastic lesions of the stomach. Comparative analysis of adenoma/dysplasia, adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:251-258
- Li YJ, Ji XR. Relationship between expression of E-cadherin-catenin complex and clinicopathologic characteristics of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:368-372
- Qiang YW, Endo Y, Rubin JS, Rudikoff S. Wnt signaling in B-cell neoplasia. *Oncogene* 2003;22:1536-1545
- Liang RY, Liao ZS, Jiang SP, Zhang W, Li JG, Zheng DH. Expression of cyclin D1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung carcinoma and their association with the prognosis. *Ai Zheng* 2003;22:86-90
- Hu JZ, Feng DY, Cheng RX. Expressions of p-MAPK, cyclin D1, p53 protein and their relationship in osteosarcoma. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2001;26:325-327
- Kolligs FT, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion* 2002;66:131-144
- Gotoh J, Obata M, Yoshie M, Kasai S, Ogawa K. Cyclin D1 over-expression correlates with beta-catenin activation, but not with H-ras mutations, and phosphorylation of Akt, GSK3 beta and ERK1/2 in mouse hepatic carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2003;24:435-442
- Ryo A, Liou YC, Lu KP, Wulf G. Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *J Cell Sci* 2003;116:773-783
- Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Res* 2002;4:14-17
- Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF. Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *EMBO J* 2003;22:2036-2046
- Sa G, Hitomi M, Harwalkar J, Stacey AW, GC GC, Stacey DW. Ras is active throughout the cell cycle, but is able to induce cyclin D1 only during G2 phase. *Cell Cycle* 2002;1:50-58
- Wong NA, Morris RG, McCondochie A, Bader S, Jodrell DI, Harrison DJ. Cyclin D1 overexpression in colorectal carcinoma in vivo is dependent on beta-catenin protein dysregulation, but not k-ras mutation. *J Pathol* 2002;197:128-135
- Sauter ER, Takemoto R, Litwin S, Herlyn M. p53 alone or in combination with antisense cyclin D1 induces apoptosis and reduces tumor size in human melanoma. *Cancer Gene Ther* 2002;9:807-812
- Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin d1 expression. *J Korean Med Sci* 2003;18:211-217
- Ma L, Yin H, Yang W, Yang G, Lu Q, Liu X. Differential expression of cyclins D1, E and A in human breast diseases. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2001;32:497-500
- Ghaneh P, Kawesha A, Evans JD, Neoptolemos JP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:1-11
- Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392



# DC负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答

郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德

郭建巍, 吕同德, 兰州军区兰州总医院实验科 甘肃省兰州市 730050  
秦力维, 兰州军区兰州总医院眼科 甘肃省兰州市 730050  
蔡美英, 四川大学华西基础医学院免疫教研室 四川省成都市 610041  
郭建巍, 男, 1965-08-03 生, 甘肃省临夏市人, 汉族. 医学博士, 主治医师.  
主要从事肿瘤免疫学方面的研究.  
项目负责人: 郭建巍, 730050, 甘肃省兰州市, 兰州军区兰州总医院实验科.  
jwkuo@sohu.com  
电话: 0931-8975413  
收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2002-12-25

## Immune responses of DC after loaded with apoptotic Hepatocellular carcinoma cells

Jian-Wei Guo, Li-Wei Qin, Mei-Ying Cai, Tong-De Lu

Jian-Wei Guo, Tong-De Lu, Department of Laboratory, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China  
Li-Wei Qin, Department of Ophthalmology, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China  
Mei-Ying Cai, Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, Sichuan Province, China  
Correspondence to: Dr. Jian-Wei Guo, Department of Laboratory, General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. jwkuo@sohu.com  
Received: 2002-12-10 Accepted: 2002-12-25

## Abstract

**AIM:** To estimate the immune responses of dendritic cells after loaded with apoptotic hepatocellular carcinoma cells.

**METHODS:** IApoptosis of hepatocellular carcinoma cells (HCCs) was induced with actinomycin-D. Interactions of DCs and apoptotic HCCs were observed under transmission electron microscope. Growth inhibition test of DC against HCC lines was also performed.

**RESULTS:** After stimulated by apoptotic HCCs pulsed DCs, the culture medium of primed lymphocytes contained a high level of Th1 cytokines IL-12 and TNF. Lymphocytes primed by apoptotic HCCs pulsed DC were not only specific lysis HCC lines but also K562 cells, and showed a characteristic of NK cells. DCs inhibited the growth of human HCC lines and other cancer cells.

**CONCLUSION:** Apoptotic HCCs pulsed DCs have a potential prospect in research and treatment in primary hepatocellular carcinoma.

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD. Immune responses of DC after loaded with apoptotic Hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1365-1368

## 摘要

**目的:** 评价树突状细胞负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答。

**方法:** 用放线菌素-D诱导肝癌细胞凋亡, 在体外用负载凋亡肝癌细胞的DC诱导自身淋巴细胞, 使其活化为肝癌特异性T细胞, 并用其进行杀伤实验。

**结果:** DC负载凋亡肝癌细胞后活化的CTL细胞分泌较高水平Th1型细胞因子IL-12和TNF, 并表现出较高的杀伤活性, 对NK细胞敏感的靶细胞慢性髓原性白血病细胞K562也有较强的杀伤作用, 提示此CTL同时具备NK特征。

**结论:** 负载凋亡肝癌细胞的DC对原发性肝癌的研究和治疗具有潜在应用价值。

郭建巍, 秦力维, 蔡美英, 吕同德. DC负载凋亡肝癌细胞后的免疫应答. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1365-1368

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1365.asp>

## 0 引言

对原发性肝癌患者DC的研究表明, 肝癌患者DC诱导同种异体淋巴细胞转化的能力降低, HLA-DR分子表达下降, 处于非成熟状态<sup>[1,2]</sup>. 因为只有成熟DC才能有效呈递抗原, 激发特异性T细胞的抗肿瘤应答, 所以从健康人DC入手使之负载肿瘤相关抗原, 持续高水平表达多种肿瘤抗原表位, 并通过MHC-I、II类分子得到充分呈递, 然后将这些功能正常且负载有肿瘤抗原的致敏DC回输患者, 诱导机体产生有效的抗肝癌免疫应答, 是肝癌治疗中一有效的途径。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** rhGM-CSF(pepro tech), rhIL-4(pepro tech), 鼠抗人DC单克隆抗体<sup>[3]</sup>(镇江医学院许化溪教授馈赠), RPMI1640(Gibco); 淋巴细胞分离液(上海试剂二厂), 新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所), MTT(华美生物工程公司); 放线菌素-D(Sigma), IL-12 P70 ELISA检测试剂盒(jingmei biotech); 细胞凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司), 兔抗人Fas-L多克隆抗体(santa cruz, USA), 羊抗兔-FITC标记二抗(华美公司); 18-25岁健康志愿者; 肝癌细胞SMMC-7721, QGY-7703, HEPG-2<sup>[4]</sup>, Alexander et al<sup>[5]</sup>, 胃癌细胞SGC-7901, 慢性髓原性白血病细胞K562, Burkitt淋巴瘤细胞Raji, L929细胞和正常人二倍体细胞为本教研室液氮保存. Elite-ESP型流式细胞检测仪(Beckman Coulter公司); 激光共聚焦显微镜(Radio); 透射电镜(Hitachi)。

1.2 方法 DC的体外诱导和培养(参照华西医科大学学报 2002;33:68). 肝癌细胞凋亡的诱导和检测<sup>[6]</sup>: 在对数生长期肝癌细胞 SMMC-7721 中加入放线菌素-D 10 mg/L, 37 °C 含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h, PBS 洗涤 3 次, TV 液消化细胞, PBS 洗涤, 将细胞重悬于 200  $\mu$ L binding buffer, 加入 10  $\mu$ L AnnexinV-FITC 和 5  $\mu$ L PI, 轻轻混匀, 4 °C 反应 30 min. 最后加入 300  $\mu$ L Binding Buffer, 将细胞混合液离心, 取细胞沉淀涂片, 激光共聚焦显微镜观察. 将凋亡的肝癌细胞和 DC 以 1:5 混合, 37 °C 含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 4 h, PBS 洗涤 3 次, 细胞沉淀用 30 g/L 戊二醛及 10 g/L 锇酸固定, 经乙醇梯度脱水, 超薄切片铅铀染色后透射电镜观察.

1.2.1 淋巴细胞培养上清中 TNF 和 IL-12 水平测定 将凋亡的肝癌细胞和 DC 以 1:5 混合, 37 °C 含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 4 h, 不完全 RPMI1640 洗涤 3 次. 将负载凋亡肝癌细胞后的 DC 与自身淋巴细胞以 1:5 混合后用含 300 KU/I 基因重组 IL-2 的完全 RPMI1640 分瓶培养, 3, 5 d 换液, 7 d 收集培养上清. 常规法检测 TNF 和 IL-12.

1.2.2 DC 活化的淋巴细胞对肝癌细胞的特异性杀伤<sup>[7]</sup> 将负载凋亡肝癌细胞的 DC 与自身淋巴细胞以 1:5 混合后用含 300 KU/I 基因重组 IL-2 的完全 RPMI1640 分瓶培养 3, 5 d 换液. 7 d 收集活化的淋巴细胞, 按  $3 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^4$  最终效靶比(E/T)分别为 6/1, 3/1, 1.5/1 分别加入 96 孔细胞培养板作效应细胞, 靶细胞分别为肝癌细胞 SMMC-7721, QGY-7703, HEPG-2, Alexander, 胃癌细胞 SGC-7901, 慢性髓原性白血病细胞 K562. 靶细胞浓度为  $5 \times 10^4$ /孔. 同时设相同浓度的效应细胞和每种靶细胞对照各 3 复孔.

1.2.3 DC 对肝癌细胞的生长抑制试验<sup>[8]</sup> 收集诱导 7 d 的 DC, 分为两组, 一组直接加入 96 孔细胞培养板中, 另一组加 LPS 10 g/L 后再加入 96 孔细胞培养板, 每一组 DC 细胞浓度分别为  $2 \times 10^5$  和  $1 \times 10^5$ /孔(效靶比分别为 2/1, 1/1), 靶细胞分别为肝癌细胞 SMMC-7721, QGY-7703, HEPG-2, Alexander, 胃癌细胞 SGC-7901, 慢性髓原性白血病细胞 K562, Burkitt 淋巴瘤细胞 Raji 和正常人二倍体细胞, 靶细胞浓度为  $1 \times 10^5$ /孔, 同时做每种靶细胞和效应细胞对照各三复孔. 效应细胞与靶细胞混合培养 16 h, 加入 5 g/L MTT 10  $\mu$ L 继续培养 8 h. 离心培养板(2 000 r/min, 10 min), 弃去上清, 每孔加 DMSO 100  $\mu$ L, 于 570 nm 处测定 A 值. 按抑制率 =  $[1 - (\text{实验孔 A 值} - \text{效应细胞对照孔 A 均值}) / \text{靶细胞对照孔 A 均值}] \times 100\%$  计算实验结果; 用肝癌细胞 Alexander 和胃癌细胞 SGC-7901 分别作靶细胞, 以效靶比 10/1, 5/1, 2.5/1 重复以上实验, 并计算抑制率.

1.2.4 DC 表面 Fas-L 表达 常规法诱导 DC, 分为两组, 一组于诱导 7 d 加入 LPS 10 g/L, 一组不加, 37 °C 含 50 mL/L CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 24 h, PBS 洗涤 2 次, 用 40 g/L 多聚甲醛 4 °C 固定 30 min, PBS 洗涤 2 次, 加

入兔抗人 Fas-L 多克隆抗体 100  $\mu$ L, 4 °C 120 min, PBS 洗涤 2 次, 加入羊抗兔 -FITC 二抗 100  $\mu$ L, 以正常人淋巴细胞作阴性对照, 4 °C 120 min, PBS 洗涤 2 次, 流式细胞术检测淋巴细胞表面 Fas-L 表达.

## 2 结果

对数生长期的肝癌细胞 SMMC-7721 经放线菌素-D 10 g/L 处理 24 h, 激光共聚焦显微镜观察, 观察早期, 主要为绿色荧光, 随着观察时间的延长, 大部分细胞出现红色和绿色两种荧光(图 1, 2).

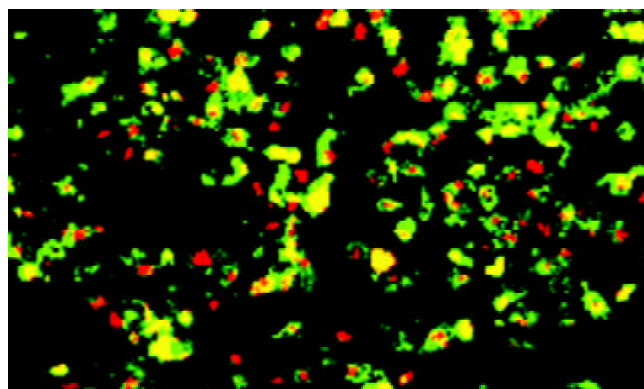


图1 激光共聚焦显微镜下的凋亡肝癌细胞( $\times 200$ ).

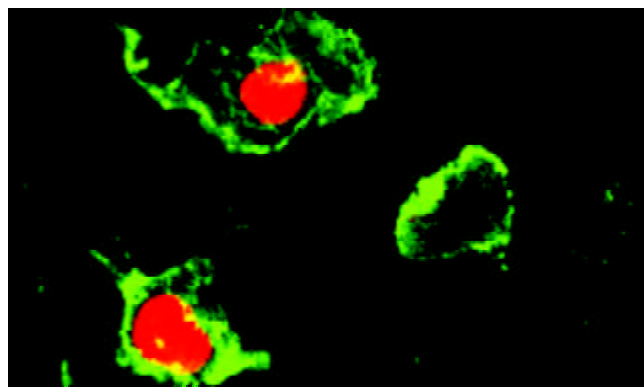


图2 激光共聚焦显微镜下的凋亡肝癌细胞( $\times 1\,000$ ).

将凋亡的肝癌细胞和 DC 共同培养后, 透射电子显微镜观察发现, DC 伸出伪足捕捉凋亡的肝癌细胞及其碎片, 有的 DC 胞质中可见电子密度较高的物质, 推测可能为吞噬的凋亡肝癌细胞及其碎片(图 3).

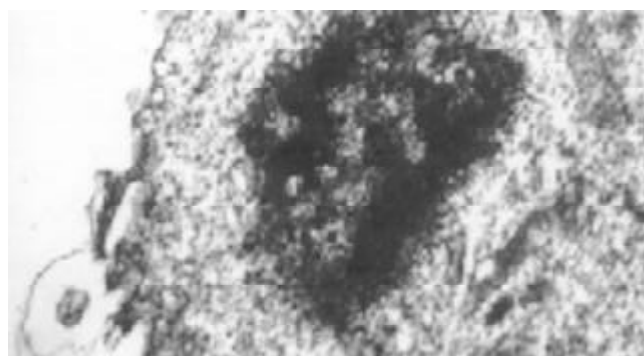


图3 扫描电镜下 DC 捕捉凋亡的肝癌细胞( $\times 5\,000$ ).

负载凋亡肝癌细胞 DC 活化的 CTL 细胞(效靶比 6 : 1-1.5 : 1)对各种肝癌细胞均有不同程度的杀伤作用(图 4, 效靶比 6 : 1), 杀伤效果明显高于非特异性淋巴细胞对照.

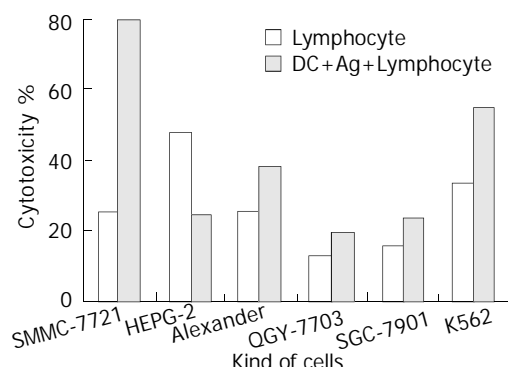


图 4 抗原特异性 T 细胞对各种肝癌细胞的杀伤作用.

效靶比为 1 : 1 时, 诱导 7 d 的 DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞均有不同程度抑制作用(抑制率 22.8-49.2 %), 但不抑制正常人二倍体细胞生长. 加入 LPS 后, DC 对 4 种肝癌细胞和胃癌细胞的抑制减弱. 随着效靶比增加为 2.5 : 1, 5 : 1 和 10 : 1 时, 诱导 7 d 的 DC 对肝癌细胞和胃癌细胞的抑制作用逐渐增加(图 5).

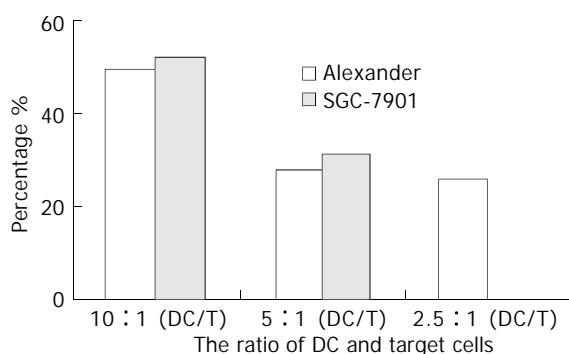


图 5 DC 对肿瘤细胞的抑制作用.

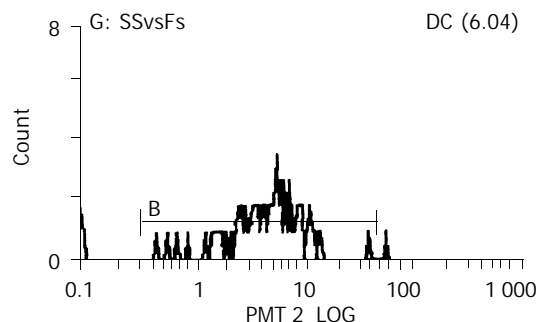
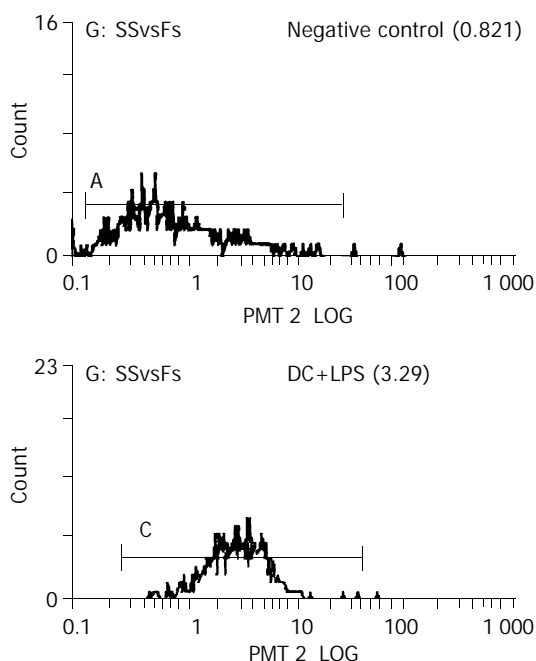


图 6 LPS 作用前后 DC 表面 Fas-L 表达.

流式细胞术检测 DC 表面 Fas-L 表达, 结果表明经 LPS 作用后, DC 表面 Fas-L 的表达略低于诱导 7 d 未处理 DC, 平均荧光强度分别为 3.29 和 6.04( $N=3$ , 图 6 ).

### 3 讨论

DC 在成为有效抗原递细胞之前必须经历一个成熟过程. 研究表明, 未成熟的 DC 可吞噬凋亡和坏死的肿瘤细胞, 而只有坏死肿瘤细胞才可诱导 DC 的成熟. 成熟 DC 表达 DC 特异性标志 CD83、与溶酶体相连的膜糖蛋白(LAMP)、及共刺激分子 CD40 和 CD86, 并可激活 CD4<sup>+</sup>T 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞. 非成熟 DC 吞噬 ACTS, 并与 MHC I、II 类分子相结合, 在坏死肿瘤细胞或其培养上清, 或标准的促成熟分子(IL-6, IL-1P, TNF- $\alpha$ , PGE2)和单核细胞条件培养基(MCM)提供的成熟信号作用下成熟, 此 DC 称为交叉呈递 DC(cross presenting DC, CPDC), CPDC 将肿瘤肽提呈给 T 细胞, 以激发免疫应答<sup>[9]</sup>.

非成熟 HLA-A2<sup>+</sup>DC 负载凋亡的 HLA-A2<sup>+</sup>, MEL-397 黑色素瘤细胞, 不能诱导 DC 的成熟, 在 IL-6, IL-1B, TNF- $\alpha$ , PGE2 作用下负载凋亡 MEL-397 的 DC 自然成熟. 经 CPDC 作用后产生的自身 CD8<sup>+</sup> CTL 经源于 MelanA/MART1 和 MAGE-3 (被 MEL397 细胞表达)HLA-A2 结合肽刺激后可产生肿瘤坏死因子(TNF); 经酪氨酸酶 HLA-A2 结合肽(MEL-397 不表达)刺激后不产生 TNF, 用 CPDC 产生的 CTL 可有效溶解 HLA-A2<sup>+</sup> MEL-256 黑色素瘤细胞, 而非成熟 DC 与肽产生的 CTL 几乎无溶解能力. 预示: 负载凋亡黑色素瘤细胞的成熟 DC 可成为黑色素瘤治疗的另一手段<sup>[10]</sup>. 用 IV 期黑色素瘤患者外周血 DC 负载经放线菌素 D 处理 24 h 的自身凋亡肿瘤细胞, 在含 60 KU/L IL-2 的培养基中, 用负载黑色素瘤凋亡小体(MABS)的 DC 每周诱导一次, 诱导 3 次后产生的效应 T 细胞可分泌高水平的 IFN- $\gamma$  (ELISPOT), 镜检证实 DC 吞噬有 MABS, 此 T 细胞为 Th<sub>1</sub> 型<sup>[11]</sup>. 用 HLA-A2<sup>+</sup> 健康志愿者外周血中非成熟 DC 负载头颈部鳞状细胞癌 PCI-13 细胞 ATCS, 非成熟 DC 和 ATCS 作用后 2-18 h 用流式细胞术和共聚焦显微镜可检测到 ATCS 被非成熟 DC 摄取, 当非成熟 DC 在细胞因子作用下成熟后, 其摄取 ATCS 的能力下降. 负载 ATCS 的 DC 诱导 CD8<sup>+</sup>CTL 的能力远远强于单独肿瘤细胞或负

载肿瘤细胞的DC<sup>[6]</sup>.

以上述理论和实验为基础,我们用DC负载凋亡的肝癌细胞,在体外诱导自身淋巴细胞使其活化为肝癌特异性T细胞,活化后的CTL细胞分泌较高水平的Th1型细胞因子IL-12和TNF,并表现出较高的杀伤活性,对NK细胞敏感的靶细胞慢性髓原性白血病细胞K562也有较强的杀伤作用,提示此CTL同时具备NK特征.预示用DC负载凋亡的肝癌细胞对原发性肝癌的研究和治疗也具潜在应用价值.我们认为,负载凋亡肝癌细胞的DC最终通过激发机体的免疫系统,诱导机体产生肝癌特异性CTL而发挥作用.以此作为主线,至少联合3种以上机制,抑制杀伤肝癌细胞.首先,DC通过吞噬和Fas/Fas-L途径,抑制肝癌细胞的生长;其次,负载凋亡肝癌细胞的DC诱发的CTL识别并杀伤部分肝癌细胞;再次,肝癌特异性CTL分泌的IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 等细胞因子,以非杀伤性方式直接或间接地抑制肝癌细胞生长繁殖.上述三种机制相辅相成,互为条件,共同发挥作用.

#### 4 参考文献

- 1 Mailliard RB, Dallal RM, Son YI, Lotze MT. Dendritic cells promote T-cell survival or death depending upon their maturation state and presentation of antigen. *Immunol Invest* 2000; 29:177-185
- 2 Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1999;31:323-331
- 3 许化溪,王胜军,潘志超,严俊,臧磊,马斌,邵启祥,李娜,刘恭植.人树突状细胞单克隆抗体的制备及其生物学应用. *中华医学杂志* 1999;79:195-196
- 4 Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282: 615-616
- 5 Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW, Lecatsas G. Establishment of continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S Afr Med J* 1976;50:2124-2128
- 6 Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Research* 2000;60:3542-3549
- 7 郭建巍,蔡美英,魏大鹏,秦力维,黄健,王霞.树突状细胞负载甲胎蛋白、细胞毒性T细胞表位肽后的免疫应答. *中华肝脏病杂志* 2002;10:178-181
- 8 Chapoval A, Tamada K, Chen L. In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* 2000;95:2346-2351
- 9 Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000;191:423-434
- 10 Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, Saurat JH, Hauser C. Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 2000;60:4446-4452
- 11 Chang JW, Peng M, Vaquerano JE, Zhou YM, Clinton RA, Hyun WC, Giedlin MA, Leong SP. Induction of Th1 response by dendritic cells pulsed with autologous melanoma apoptotic bodies. *Anticancer Res* 2000;20:1329-1336

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

#### • 读者来信 •

尊敬的世界华人消化杂志编辑部的同志:您好!

世界华人消化杂志的我比较喜爱的专业期刊之一,因为它信息量大且内容更新较快.我本人也曾在贵刊发表过论文.现在,贵刊编辑部免费提供如此多的电子版文献,为我能更好地学习和更新知识,及时了解学科发展新动向提供了极大的便利,非常感谢!

(汤伟 2003-08-06)



# TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用

李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平

李小安, 秦建平, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083  
房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038  
李小安, 男, 1968-09-01 生, 安徽省东至县人, 汉族, 2002 年第三军医大学博士毕业. 现工作单位为成都军区总医院消化内科. 发表文章 10 篇, 研究方向为消化道肿瘤.  
全军“十五”科研基金资助项目, No.01MA172  
项目负责人: 房殿春, 400038, 重庆市高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心.  
电话: 028-86570349  
收稿日期: 2002-08-24 接受日期: 2002-10-12

## Role of TRAIL in inducing apoptosis of SMMC-7721 cells

Xiao-An Li, Dian-Chun Fang, Pei-Ren Si, Ru-Gang Zhang, Liu-Qin Yang, Jian-Ping Qing

Xiao-An Li, Jian-Ping Qing, Department of Gastroenterology, Chinese PLA, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China  
Dian-Chun Fang, Pei-Ren Si, Ru-Gang Zhang, Liu-Qin Yang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Supported by the Scientific Research Programs Foundation during the Tenth Five-Year Plan of PLA, No. 01MA172  
Correspondence to: Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China  
Received: 2002-08-24 Accepted: 2002-10-12

## Abstract

AIM: To observe the role of TRAIL in inducing apoptosis of SMMC-7721 cells.

METHODS: The survival fraction of SMMC-7721 cells was measured by MTT assay; Apoptosis rate was determined by TUNEL method and the ultramicrostructure of apoptotic cells induced by TRAIL was observed by electron-microscopy.

RESULTS: The role of TRAIL in survival fraction and apoptosis rate demonstrated a good relationship and the typic structure of apoptotic cells was found in some cells treated by TRAIL.

CONCLUSION: TRAIL can induce apoptosis in SMMC-7721 cells.

Li XA, Fang DC, Si PR, Zhang RG, Yang LQ, Qing JP. Role of TRAIL in inducing apoptosis of SMMC-7721 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1369-1371

## 摘要

目的: 观察 TRAIL 诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用。

方法: 采用 MTT 法检测细胞存活分数; TUNEL 法检测细胞

凋亡率; 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期; 电镜观察凋亡细胞超微结构。

结果: TRAIL 对 SMMC-7721 细胞的存活分数和凋亡率的影响呈典型的量效关系, 经 TRAIL 作用后的细胞, 流式细胞仪检测呈标准的亚二倍峰, 电镜观察发现经 TRAIL 作用的部分细胞具有凋亡细胞的典型形态特征。

结论: TRAIL 可诱导 SMMC-7721 细胞凋亡。

李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平. TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1369-1371  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1369.asp>

## 0 引言

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因是 Wiley 小组于 1995 年最早克隆和命名的, 为 TNF 家族成员<sup>[1]</sup>. 近年来, 人们发现其可以诱导肿瘤细胞凋亡, 对正常细胞的影响却很少, 因而受到了国内外学者的广泛重视<sup>[1, 2]</sup>. 在本文中, 我们研究了 TRAIL 诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 可溶性 TRAIL 蛋白(氨基酸 114-281, 带六聚组氨酸尾)由本实验室生产; MTT 购自上海生物工程技术公司; TUNEL 原位凋亡检测试剂盒购自罗氏公司; RPMI1640 培养基购自 Sigma 公司; 肝癌细胞株 SMMC-7721 由本实验室保种。

1.2 方法 细胞培养: SMMC-7721 细胞培养于含 100 mL/L 灭活的小牛血清、100 kU/L 青霉素和链霉素的 RPMI1640 的培养液中, 培养条件为 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度, 每 2-3 d 用 2.5 g/L 胰酶消化, 以 1:3-1:5 传代. MTT 法测细胞存活分数<sup>[3]</sup>: 以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用含 50 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 配成单个细胞悬液, 按每孔 3 × 10<sup>3</sup> 个细胞接种于 96 孔板, 每孔终体积为 200 μL, CO<sub>2</sub> 孵箱内培养 2-3 d 后按 50 μg/L, 150 μg/L, 500 μg/L, 1 500 μg/L, 5 000 μg/L 的剂量分别给予 TRAIL, 对照组给予同体积的 PBS, 药物作用 24 h. 测值前 4 h 每孔加 20 μL 5 g/L MTT, 孵育后吸去孔内上清, 每孔加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 酶联免疫检测测 A<sub>570</sub> 值. 细胞存活分数(survival fraction)=实验组 A<sub>570</sub>/对照组 A<sub>570</sub> × 100 %. 实验重复 3 次, 取平均值。

TUNEL 法检测 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响: 将无菌的盖玻片置于六孔板中, 每孔一片. 取对数生长期细胞以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液配成单个细胞悬液, 稀释成  $5 \times 10^8/L$ . 取 0.5 mL 滴于盖玻片上,  $37^\circ C$ 、50 mL/L  $CO_2$ 、饱和湿度下孵育 2 h 后, 每孔加培养液 2 mL, 次日, 每孔加入不同浓度(剂量同 MTT 法)的 TRAIL. 24 h 后, 按 TUNEL 试剂盒说明操作, DAB 显色后, 高倍镜(400 $\times$ )下随机数 200 个细胞, 记下凋亡细胞数和未凋亡细胞数, 共数 5 个视野. 细胞凋亡率(apoptosis rate)= 凋亡细胞数/(凋亡细胞数+未凋亡细胞数) $\times 100\%$ . 流式细胞仪测定 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞的凋亡率和细胞周期的影响: 按 0  $\mu g/L$ (对照组)、200  $\mu g/L$ (T1 组)、400  $\mu g/L$ (T2 组)给予 TRAIL, 24 h 后收集不同浓度药物处理组的细胞, PBS 漂洗 2 次, 750 mL/L 冷乙醇固定 24 h, PI 染色后, 用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率. 电镜: 待 SMMC-7721 细胞长至对数生长期, 取两瓶细胞, 分别加 100  $\mu g/L$  的 TRAIL 和同体积的 PBS, 作用 24 h 后, 常规胰酶消化细胞, PBS 洗 2 次, 30 g/L 的戊二醛固定后送检.

## 2 结果

2.1 TRAIL 对肝癌 SMMC-7721 细胞存活分数的影响 TRAIL 作用于肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h, 细胞的存活分数从 50  $\mu g/L$  的 89.1 % 降至 5 000  $\mu g/L$  27.2 %, 存在较好的量效关系.

2.2 TRAIL 对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响 TRAIL 能明显诱导 SMMC-7721 细胞凋亡, 存在较好的量效关系, 见图 1.

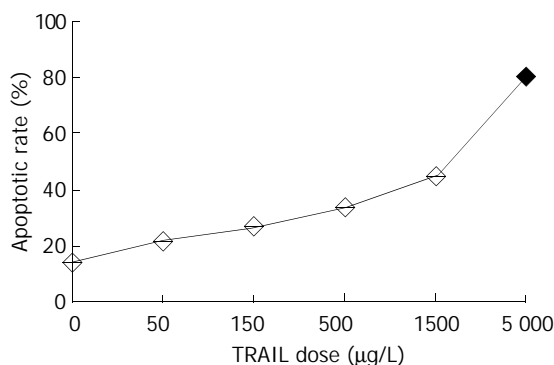


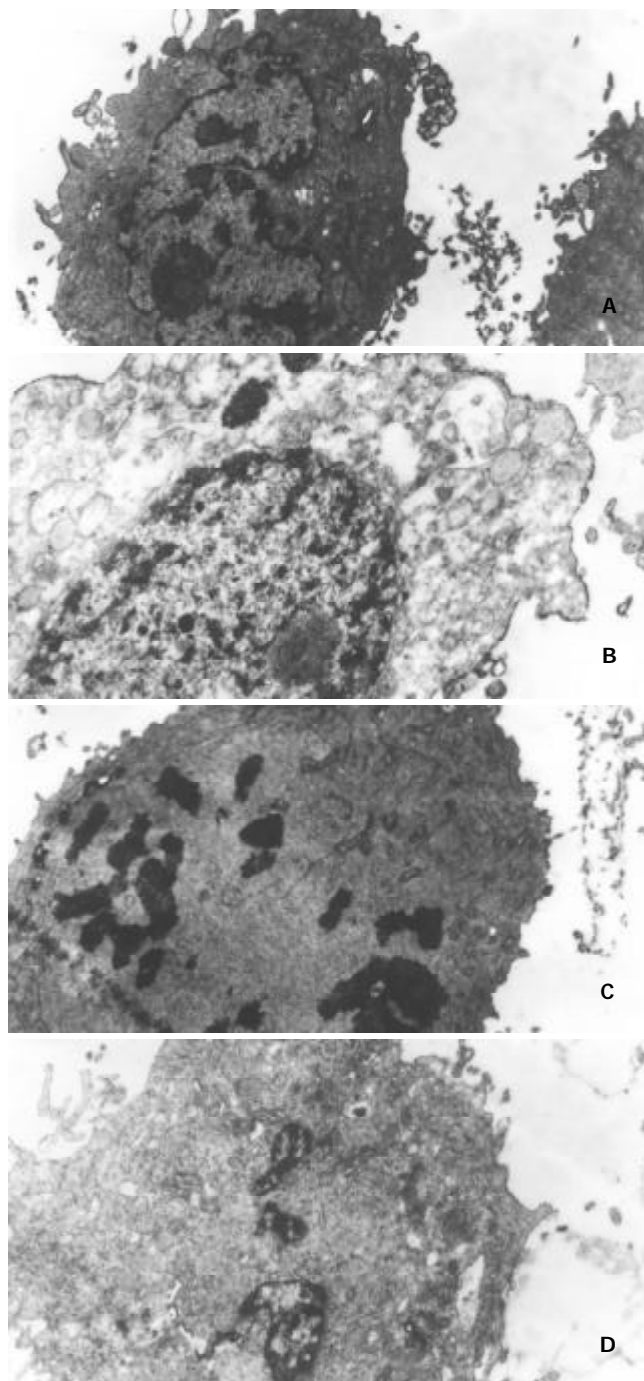
图 1 TRAIL 对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响.

2.3 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞的凋亡率和细胞周期的影响 400  $\mu g/L$  的 TRAIL 作用于 SMMC-7721 细胞, 可见明显的亚二倍峰形成, TRAIL 还可使 S 期细胞的比例增加,  $G_2M$  期细胞的比例减少, 结果见表 1.

2.4 电镜 未经处理的 SMMC-7721 细胞, 胞膜微绒毛和伪足多见, 核大、核内有多个核仁(图 1A). 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 线粒体空泡化(图 1B), 核浓缩、碎裂(图 1C), 凋亡小体形成(图 1D).

表 1 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞细胞周期和凋亡率的影响

分组	TRAIL 剂量( $\mu g/L$ )	细胞周期			凋亡率(%)
		$G_0/G_1$	S	$G_2M$	
对照组	0	0.39	0.08	0.53	0.72
T1 组	200	0.47	0.28	0.25	19.31
T2 组	400	0.30	0.45	0.25	23.83



A 未处理细胞, 胞膜微绒毛和伪足多见, 核大、核内有多个核仁.  
B 经 TRAIL 作用后的细胞线粒体空泡化.  
C 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 核浓缩、碎裂.  
D 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 凋亡小体形成.

## 3 讨论

TRAIL 是 TNF 家族成员, 有五种受体即 DR4, DR5, DcR1, DcR2 和 OPG. TRAIL 与 DcR1, DcR2 和 OPG 结

合不能诱导细胞凋亡, 但与 DR4, DR5 结合可导致细胞凋亡<sup>[4-20]</sup>. 我们以前曾证实 TRAIL 对结肠癌细胞系 SW480 有杀伤作用<sup>[21]</sup>. 本研究我们发现 TRAIL 可以诱导 SMMC-7721 细胞凋亡. 经 TRAIL 作用后的 SMMC-7721 细胞经流式细胞仪检测, 出现典型的亚二倍峰, 该峰的出现是凋亡的特征之一<sup>[22]</sup>. 此外, 我们的电镜结果发现, 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 核浓缩、碎裂, 凋亡小体形成, 具有凋亡细胞的典型形态特征. 因此, 我们有充足的证据表明 TRAIL 是通过诱导细胞凋亡的方式起抗肿瘤作用的. TRAIL 诱导的细胞凋亡涉及线粒体膜电位的改变, 线粒体释放细胞色素 C<sup>[8-10, 23-26]</sup>, 而我们用电镜观察到经 TRAIL 作用后的 SMMC-7721 细胞线粒体空泡化, 这种功能和形态的变化有可能存在一定的联系. 流式细胞仪的结果表明 TRAIL 可使 SMMC-7721 细胞 G<sub>2</sub>M 期细胞的比例减少, 证实 TRAIL 可能有抑制细胞增生的作用, S 期为细胞的 DNA 合成期, TRAIL 为什么使 SMMC-7721 细胞 S 期细胞的比例增加, 值得进一步研究.

早期的研究发现 TRAIL 诱导细胞凋亡有很高的选择性, 即仅诱导被病毒感染的细胞、转化细胞和肿瘤细胞凋亡, 对正常细胞的影响很小<sup>[1, 2]</sup>. 最近人们发现 TRAIL 可诱导正常肝细胞凋亡, 但 caspase-9 的抑制剂 Z-LEHD-FMK 可以保护正常人的肝细胞, 而不影响 TRAIL 对一些肿瘤细胞的杀伤作用, 可能与 TRAIL 诱导不同的细胞凋亡存在不同的传导通路有关<sup>[27]</sup>. 我们发现 TRAIL 可诱导肝癌细胞凋亡, 并提示可能与线粒体通路有关.

#### 4 参考文献

- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-682
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-12690
- 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 第 1 版. 西安: 世界图书出版社, 1996:186
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308
- Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 2001;3:535-546
- Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, Findlay DM. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 2002;99:491-504
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273:14363-14367
- Yamada H, Tada-Oikawa S, Uchida A, Kawanishi S. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:130-133
- Rocklin OW, Guseva N, Tagiyev A, Knudson CM, Cohen MB. Bcl-2 oncoprotein protects the human prostatic carcinoma cell line PC3 from TRAIL-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001;20:2836-2843
- Thomas WD, Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria. *J Immunol* 2000;165:5612-5620
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-113
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-818
- Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 1997;7:693-696
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386-5397
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-821
- Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 1997;186:1165-1170
- MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1997;272:25417-25420
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997;7:1003-1006
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997;7:813-820
- Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM. TRUND, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett* 1998;424:41-45
- 李小安, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉. TRAIL 蛋白的表达、纯化和抗肿瘤活性. 第三军医大学学报 2001;23:1058-1060
- 姜泊. 细胞凋亡基础与临床. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1999: 11-12
- Sarker M, Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Lopez-Rivas A. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncogene* 2002;21:4323-4327
- Rohn TA, Wagenknecht B, Roth W, Naumann U, Gulbins E, Krammer PH, Walczak H, Weller M. CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 2001;20:4128-4137
- Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri ES, Calabretta B. Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol* 2001;21:3025-3036
- Holler N, Zaru R, Mischeau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000;1:489-495
- Ozoren N, Kim K, Burns TF, Dicker DT, Mosconi AD, El-Deiry WS. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000;60:6259-6265

# 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究

吴正蓉, 申 洪

吴正蓉, 申洪, 中国人民解放军第一军医大学病理学教研室  
广东省广州市 510515

吴正蓉, 女, 1976-08-13 生, 安徽省蚌埠市人, 汉族. 1999 年蚌埠医学院本科毕业, 2002 年第一军医大学硕士研究生毕业, 助教. 主要从事肿瘤病理和定量病理研究.

国家自然科学基金资助课题, No. 39000029 和 No. 39570677

项目负责人: 申洪, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学病理学教研室. hongshen@fimmu.com

电话: 020-61648227 传真: 020-61640212

收稿日期: 2002-03-19 接受日期: 2002-03-27

## Quantitative ultrastructure of mitochondrion in colorectal carcinoma

Zheng-Rong Wu, Hong Shen

Zheng-Rong Wu, Hong Shen, Department of Pathology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39000029 and No. 39570677

Correspondence to: Hong Shen, Department of Pathology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China.  
hongshen@fimmu.com

Received: 2002-03-19 Accepted: 2002-03-27

## Abstract

**AIM:** To study quantitatively the ultrastructure characteristics and the change order of mitochondrion in colorectal carcinoma, colorectal adenoma and normal colorectal mucosa with stereological methods. Moreover their major approaches of energy metabolism were clarified.

**METHODS:** The specimens of 8 colorectal adenocarcinomas, 8 colorectal adenomas and 8 normal colorectal mucosae were obtained from the surgical resections and colonoscopy. Photographs were randomly taken in transmission electron-microscope according to stereology, and then the parameters were calculated in mitochondrion in glandulose epithelia cells involving volume density (Vv), surface density (Sv), numerical density (Nv), mean free distance of components ( $\lambda$ ), form factor PE (PE), improved form factor PE (pe), regular form factor (RFF), average volume (v) and average surface area (s) referring in cytoplasm. Their difference was compared.

**RESULTS:** The comparison between colorectal adenocarcinoma, colorectal adenoma and normal colorectal mucosa at the mitochondrion was performed to reveal the significances in Sv, Nv, pe, REF (The value of F-test was 0.0 438, 0.0 184, 0.0 488, 0.0 114, respectively,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The hyperplasia in the mitochondrion of colorectal adenoma is evidently. The amount is decreased in the mitochondrion of colorectal adenocarcinoma.

Wu ZR, Shen H. Quantitative ultrastructure of mitochondrion in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1372-1374

## 摘要

**目的:** 利用体视学方法, 定量研究大肠腺癌、腺瘤及正常黏膜上皮线粒体的超微结构特点和变化规律并阐明其能量代谢的主要途径.

**方法:** 手术大肠腺癌 8 例、肠镜大肠腺瘤 8 例、大肠癌患者正常黏膜 8 例. 按体视学原理和方法在电镜下随机摄片, 以胞质为参照空间, 测试腺上皮细胞中线粒体的体积密度 (Vv)、表面积密度 (Sv)、数密度 (Nv)、平均自由程 ( $\lambda$ )、形状因子 (PE)、改良形状因子 (pe)、规化形状因子 (RFF)、平均体积 (v) 及平均表面积 (s), 比较这些参数在不同组织间的差异.

**结果:** 大肠腺癌、腺瘤和正常黏膜三组间比较, 参数 Sv, Nv, pe, REF 值组间差异有显著性 (F 值分别为 0.0 438, 0.0 184, 0.0 488, 0.0 114,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 大肠腺瘤线粒体增生明显, 较腺癌和正常组织增大, 大肠腺癌癌细胞线粒体减少.

吴正蓉, 申洪. 大肠肿瘤组织线粒体形态结构定量研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1372-1374

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1372.asp>

## 0 引言

大肠癌是人类主要恶性肿瘤之一, 近几年来在我国特别是大城市有上升的趋势, 并已成为我国最为常见和危害性严重的恶性肿瘤. 然而从三维水平对大肠癌超微结构进行系统的定量研究, 尚未见报道<sup>[1-3]</sup>. 我们用体视学方法, 从三维超微水平对 8 例大肠腺癌、腺瘤及其正常黏膜上皮细胞中的线粒体进行了定性观察与定量研究, 为讨论其功能和形态结构变异提供定量依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 南方医院外科手术切除的和消化内科肠镜活检的大肠腺癌和腺瘤大体病检标本各 8 例, 同时取大肠癌患者的自身正常大肠黏膜, 所有标本均按透射电镜生物样品常规处理, 随机取材、常规电镜制样<sup>[4]</sup>. 每例组织各包埋 3-5 块, 每块经瑞典 LKB-V 型超薄切片机制片, 制铜网 2 个.

**1.2 方法** 在 JEM1200-EX 型透射电镜下观察、摄片. 超薄切片前先行半薄切片确定取材部位与诊断是否相符并明确癌、瘤及正常黏膜细胞在切片中的部位. 在电镜下对观测目标随机确定视野并摄片. 腺癌组和腺瘤组每例标本随机取 10 个视野, 正常组每例标本取 20 个视

野, 腺癌组和腺瘤组各摄片 80 张, 正常组摄片 160 张, 放大倍数统一为 8 000 倍. 按体视学原理, 线粒体三维体视学参数的分析以每例标本中的所有照片为一个样本, 线粒体平面形状分析以每个线粒体为基本样本单位<sup>[5]</sup>. 采用 Imagepro 图像分析软件进行测试, 将电镜底片用扫描仪 AGFA DuoScan HiD 输入计算机, 然后将其反转成照片格式并在交互式操作方式下通过光标分别勾描每幅照片的线粒体, 测试其周长、面积、圆度、长轴及短轴, 同时测试每幅照片的面积<sup>[6]</sup>. 以每幅照片中所洗印出的尺度标刻对图像分析软件中的像素进行标定<sup>[7]</sup>. 选用的体视学参数有: 体积密度( $V_v$ )、表面积密度( $S_v$ )、平均自由程( $\lambda$ )、数密度( $N_v$ )、平均体积( $v$ )和平均表面积( $s$ ); 此外还有平面形态参数: 正常线粒体、空泡化线粒体及全部线粒体的形状因子(PE)、改良形状因子( $pe = 1/PE \times 1.064$ )和规化形状因子(RFF)<sup>[8]</sup>. 按体视学公式计算出参数值(实用生物体视学技术. 广州: 中山大学出版, 1991: 64), 密度参数的参照空间为细胞质<sup>[9]</sup>.

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件包, 对线粒体的有关参数值分别进行单因素方差分析和多组间两两比较 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异具有显著性.

## 2 结果

大肠腺癌癌细胞线粒体肿胀, 数量较少, 形态较大偏圆形(图 1); 腺瘤细胞线粒体数量较多, 形态较接近正常(图 2).  $V_v$ ,  $S_v$  和  $N_v$  值腺瘤组大于正常组大于腺癌组,  $S_v$  和  $N_v$  值组间差异有显著性( $P < 0.05$ ),  $V_v$  值组间差异接近显著性水平( $P = 0.087$ );  $\lambda$  腺瘤组小于正常组小于腺癌组, 组间差异接近显著性水平( $P = 0.054$ );  $v$ ,  $s$  值腺癌组大于腺瘤组大于正常组, 但组间差异无显著性( $P > 0.05$ ); 在多组间两两比较中,  $V_v$ ,  $S_v$  值是腺癌组与腺瘤组差异有显著性( $P < 0.05$ ),  $\lambda$  和  $N_v$  是腺癌组与腺瘤组及腺癌组与正常组差异均有显著性( $P < 0.05$ ),  $v$ ,  $s$  值各组两两比较差异均无显著性. 平面形态定量参数比较: PE 和 RFF 值腺癌组小于腺瘤组小于正常组,  $pe$

值相反,  $pe$ , RFF 值组间差异有显著性( $P < 0.05$ ); 在多组间两两比较中, PE,  $pe$ , RFF 值腺癌组与正常组组间差异均有显著性差异( $P < 0.05$ ), 但差值不大(表 1).

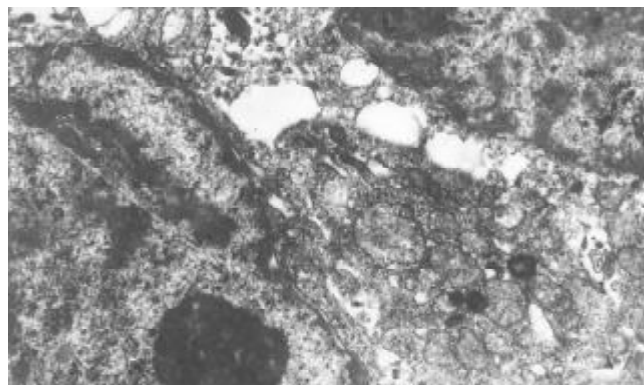


图 1 大肠腺癌癌细胞线粒体.

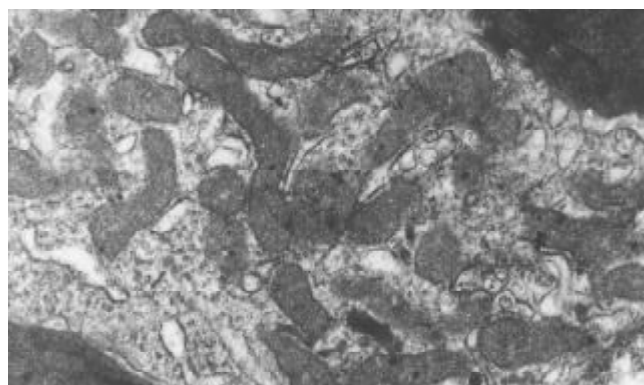


图 2 大肠腺瘤腺瘤细胞线粒体.

## 3 讨论

大肠腺癌、大肠腺瘤和正常大肠黏膜组织的形态结构不同, 在超微结构上也存在明显差别<sup>[10, 11]</sup>. 体视学可通过多个体视学参数从量化角度反映有关组织和细胞的三维结构特征, 从而对不同形态结构的组织和细胞进行定量描述和鉴别<sup>[12-26]</sup>. 以往对大肠癌线粒体超微结构

表 1 大肠腺癌、腺瘤及正常组织间线粒体结构定量测试结果( $\bar{x} \pm s$ )

参数	单位	腺癌(1)	腺瘤(2)	正常(3)	比较组间 P 值			
					(1)(2) <sup>a</sup>	(1)(2) <sup>b</sup>	(1)(3) <sup>b</sup>	(2)(3) <sup>b</sup>
$V_v$		0.0273±0.0 188	0.0 535±0.0 244	0.0 407±0.0 216	0.08 743	0.029	0.229	0.265
$S_v$	$\mu m^{-1}$	0.3063±0.2 048	0.6 761±0.3 231	0.5 637±0.2 861	0.0 438	0.017	0.074	0.436
$\lambda$	$\mu m$	17.053±9.1 898	8.1 765±7.193	8.9 317±5.4 593	0.0 538	0.032	0.041	0.847
$N_v$	$\mu m^{-3}$	0.2 492±0.1 566	0.6 316±0.3 405	0.6 056±0.2 877	0.0 184	0.012	0.015	0.853
$v$	$\mu m^3$	0.1 203±0.0 747	0.096±0.042	0.0 679±0.0 986	0.138	0.361	0.05	0.291
$S$	$\mu m^2$	1.2 925±0.5 058	1.1 518±0.2 977	0.9 335±0.0 893	0.137	0.44	0.05	0.235
PE		0.814±0.1 101	0.8 211±0.1 187	0.8 235±0.1 079	0.0 612	0.095	0.018	0.441
$pe$		1.1831±0.2 239	1.1 788±0.2 495	1.167±0.204	0.0 488	0.617	0.045	0.052
RFF		0.9 281±0.0 389	0.931±0.0 394	0.9 323±0.0 377	0.0 114	0.052	0.003	0.234

a 表示 F 检验, b 表示多组间两两比较 LSD-t 检验.



的研究为定性观察,国内外学者注意到癌细胞中线粒体数量较少,形态常较大,多数肿胀,嵴减少或断裂,甚至消失,有不同程度的变性,部分线粒体呈空泡状<sup>[27, 28]</sup>。我们在前人研究结果的基础上,通过定量测试和分析从三维水平和量化角度揭示了大肠腺癌线粒体超微结构的定量改变特点,不仅如此,我们还发现大肠腺癌线粒体的超微结构定量改变不是减少而是增多,表现在线粒体的体积密度、表面积密度和数密度均较正常黏膜上皮及腺癌增多。PE和RFF值腺癌组小于腺瘤组小于正常组,pe值相反且pe、RFF值组间差异有显著性,说明了腺癌细胞较腺瘤细胞较正常上皮细胞线粒体形态更不规则,更加偏离圆的特点。同时体视学参数平均体积和平均表面积是腺癌组大于腺瘤组大于正常组,在多组间两两比较中腺癌组与正常黏膜组比较,  $P=0.05$ 。这定量表述了癌细胞线粒体肿胀,嵴膜面积减小,嵴变的短而少的形态结构变化特点。 $\lambda$ 表示粒子的离散程度,其值越大粒子越分散,越小粒子越密集。本研究腺癌组大于正常组大于腺瘤组,且差值悬殊,腺瘤组 $\lambda$ 值最低,说明腺瘤中线粒体成密集增生状态。

细胞器在生物新陈代谢的过程中起着重要的作用,其形态结构与功能有着紧密的联系。我们的结果表明线粒体的体积密度、表面积密度和数密度均表现为腺瘤组大于正常组大于腺癌组,且差值明显,腺瘤组和腺癌组差值约在一倍左右。根据体积密度、表面积密度和数密度参数定义可知癌细胞中单位体积细胞质中线粒体的膜面积和数目明显减小,导致癌细胞线粒体的生物氧化产能的结构基础相对下降,氧化代谢减弱。人们已认识到癌细胞糖的能量代谢以无氧酵解为主<sup>[29, 30]</sup>,我们同意这一结论。不仅如此我们还认为,造成癌细胞的糖代谢以无氧酵解为主的根源是癌细胞中线粒体的相对体积、相对表面积及相对数量的减少,这是癌细胞有氧代谢产能障碍后能量代谢代偿的自然选择。腺瘤细胞单位体积细胞质中线粒体的膜面积和数目明显增大,且呈密集增生状态( $\lambda$ 值最低),表明腺瘤的能量代谢非常旺盛,且其能量代谢应该以有氧代谢为主而不是以无氧酵解为主并且其能量代谢较腺癌和正常组织更为活跃。

#### 4 参考文献

- 1 Yi PY, Yang GH, Tan YS. Nuclear morphometric analysis of colorectal adenocarcinoma and its clinicopathologic significance. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 1994;23:141-143
- 2 Ikeguchi M, Sakatani T, Endo K, Makino M, Kaibara N. Computerized nuclear morphometry is a useful technique for evaluating the high metastatic potential of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1999;86:1944-1951
- 3 Carson HJ, Buschmann RJ, Cintron J, Weisz-Carrington P. Prognostic histomorphometry in colorectal adenocarcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17:109-112
- 4 丁晓平, 申洪. 大肠癌体视学定量及取材方向对其影响的研究. *临床肿瘤学杂志* 2000;5:5

- 5 申洪. 大肠癌体视学诊断参数分析. *实用肿瘤杂志* 1991;6:33
- 6 Van Hensbergen Y, Luykx-de Bakker SA, Heideman DA, Meijer GA, Pinedo HM, van Diest PJ. Rapid stereology based quantitative immunohistochemistry of dendritic cells in lymph nodes: a methodological study. *Anal Cell Pathol* 2001;22:143-149
- 7 丁晓平, 申洪. 病理组织结构定量的显微测试网格与图像分析仪测试的比较. *中国体视学与图像分析* 1999;4:102-105
- 8 丁晓平, 申洪. 大肠癌的体视学定量诊断研究. *中国体视学与图像分析* 1999;4:219-225
- 9 Shen H. Regular form factor. A new concept and calculating method for quantitative form description. *Anal Quant Cytol Histol* 2000;22:453-458
- 10 王凤安, 闫庆辉, 郝民和, 廖海鹰, 张玉印, 薄贻康, 李相印, 王莉. 大肠癌不同部位扫描电镜观察及其临床意义. *武警医学* 1999;10:5-8
- 11 张洁波, 郝宝铭. 大肠癌及其癌前病变定量形态学研究. *上海医学* 1995;18:686-689
- 12 丁晓平, 申洪. 定量病理学技术在大肠癌研究中的应用进展. *中国体视学与图像分析* 1998;3:114-120
- 13 Mariuzzi GM, Collan YU. Some reflections on the history, and presence of quantitative pathology. *Pathologica* 1995;87:215-220
- 14 Glaser JR, Glaser EM. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *J Chem Neuroanat* 2000;20:115-126
- 15 杨兴龙, 申洪. 鼻咽癌形态学发生发展的体视学定量研究. *第四军医大学学报* 2001;10:0936-0938
- 16 杨兴龙, 申洪, 宗永生. 鼻咽癌及癌旁组织的超微结构形态定量. *第四军医大学学报* 2001;22:1599-1602
- 17 过贵元, 张忠, 吴生泉, 申洪. 大鼠实验性视网膜缺血组织中线粒体的表面积密度及其动态研究. *中国体视学与图像分析* 2002;7:36-48
- 18 Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1100-1123
- 19 Geuna S. Appreciating the difference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system. *J Comp Neurol* 2000;427:333-339
- 20 Meijer GA, Meuwissen SG, Baak JP. Classification of colorectal adenomas with quantitative pathology. Evaluation of morphometry, stereology, mitotic counts and syntactic structure analysis. *Anal Cell Pathol* 1995;9:311-323
- 21 Gil J, Wu H, Wang BY. Image analysis and morphometry in the diagnosis of breast cancer. *Microsc Res Tech* 2002;59:109-118
- 22 Zaitoun AM, Al Mardini H, Awad S, Ukabam S, Makadisi S, Record CO. Quantitative assessment of fibrosis and steatosis in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. *J Clin Pathol* 2001;54:461-465
- 23 Ikeguchi M, Cai J, Oka S, Gomyou Y, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Nuclear profiles of cancer cells reveal the metastatic potential of gastric cancer. *J Pathol* 2000;192:19-25
- 24 Howard CV. Quantitative microscopy in studies of intrauterine growth retardation. *J Pathol* 1997;183:129-130
- 25 Ishikawa F, Saito N, Koda K, Takiguchi N, Oda K, Suzuki M, Nunomura M, Sarashina H, Miyazaki M. Nuclear morphometric analysis of T2 lesions of the rectum-a simple, reproducible method for predicting malignancy potential. *Am J Surg* 2002;183:686-691
- 26 Donois E, del Marmol V, Taieb A, Ghanem G, Surleve-Bazeille JE. Quantification of eumelanin and pheomelanin: stereologic image analysis method. *Anal Quant Cytol Histol* 1998;20:275-287
- 27 陈通, 张子强, 尹利佳, 朱有法, 石元和, 沈祥骥. 大肠癌超微结构的观察. *实用肿瘤杂志* 1989;4:84-86
- 28 彭麟, 刘建伟, 王鸿烈, 任宏造. 人大肠黏膜上皮和大肠癌细胞超微结构的对比观察. *中华肿瘤杂志* 1985;7:271-273
- 29 陈珂, 蝗国铮, 胡闻, 涂景林. 大肠癌酶细胞化学及电镜观察. *肿瘤防治研究* 1995;22:218-221
- 30 苗德林, 易永芬, 黄幼蓉, 程本宽, 李维信. 大肠癌生物学行为的初步研究 - 有关酶组织化学与超微结构的观察. *肿瘤* 1987;7:155-157

# IL-4增强IL-2活化的A-NK细胞对人直肠癌CC95的抗肿瘤作用

王志华, 申宝忠, 史 历

王志华, 史历, 哈尔滨医科大学肿瘤研究所 黑龙江省哈尔滨市 150040  
申宝忠, 哈尔滨医科大学第三临床医学院 黑龙江省哈尔滨市 150040  
王志华, 男, 1951-03-05 生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 1978年毕业于哈尔滨医科大学, 研究员, 主要从事肿瘤免疫学和肿瘤分子生物学研究。  
国家自然科学基金课题, No.39270765  
黑龙江省重点攻关课题, No.G00C190401  
项目负责人: 王志华, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号, 哈尔滨医科大学肿瘤研究所. hljwzh@163.com  
电话: 0451-2620314 传真: 0451-6665003  
收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2002-12-26

## IL-4 enhances antitumor effect of IL-2 induced A-NK Cells on human colon carcinoma

Zhi-Hua Wang, Bao-Zhong Shen, Li Shi

Zhi-Hua Wang, Li Shi, Cancer Research Institute, Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China  
Bao-Zhong Shen, The Third College of Clinical Medicine, Harbin Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39270765 and the Key Programs of Foundation of Heilongjiang Province, No.G00C190401  
Correspondence to: Dr Zhi-Hua Wang, Cancer Research Institute, Harbin Medical University, 150 Haping Road, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China. hljwzh@163.com  
Received: 2002-12-10 Accepted: 2002-12-26

## Abstract

AIM: Using IL-4 combined with IL-2 to induce A-NK cells and to evaluate the cytotoxicity of A-NK cells and its inhibiting effect on colon tumor growth.

METHODS: The A-NK cells were activated with recombinant lymphokine IL-2 combined IL-4, the cytotoxicity of the effector cells was determined by LDH-L release assay. Its antitumor effect was investigated through growth inhibiting of human colon carcinoma cells in nude mice.

RESULTS: IL-2 alone or combined with IL-4 could induce the activity of A-NK cells successively which could kill K562, Anip973 and CC95 tumor cells *in vitro* by LDH-L release assay ( $39.00 \pm 9.16$  vs  $77.68 \pm 12.80$ ,  $43.10 \pm 10.05$  vs  $80.02 \pm 13.74$ ,  $42.14 \pm 9.72$  vs  $79.10 \pm 12.65$ ,  $P < 0.01$ ) and inhibit the growth of human colon carcinoma cells in nude mice ( $1.04 \pm 0.15$  vs  $0.62 \pm 0.16$ ,  $P < 0.01$ ). The results suggested that there was expression of IL-4 receptor on the surface of A-NK cells.

CONCLUSION: IL-4 can enhance the antitumor activity of IL-2 induced A-NK cells. The method may have some potential application value in human cancer treatment.

Wang ZH, Shen BZ, Shi L. IL-4 enhances antitumor effect of IL-2 induced A-NK Cells on human colon carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1375-1377

## 摘要

目的: 用IL-4联合IL-2共同诱导A-NK细胞, 研究A-NK细胞体外细胞毒性及对直肠肿瘤生长的抑制作用。

方法: 用基因重组的IL-2和IL-4联合活化A-NK细胞, 用LDH-L释放法测定效应细胞的细胞活性, 同时观察A-NK细胞对人直肠癌细胞在裸鼠体内的生长抑制作用。

结果: IL-2单独或IL-2联合IL-4均可以诱导A-NK细胞, 但二者联合效果更好, 通过LDH-L测定活化的A-NK细胞可在体外杀伤K562, Anip973和CC95细胞( $39.00 \pm 9.16$  vs  $77.68 \pm 12.80$ ,  $43.10 \pm 10.05$  vs  $80.02 \pm 13.74$ ,  $42.14 \pm 9.72$  vs  $79.10 \pm 12.65$ ,  $P < 0.01$ ), 抑制人直肠癌肿瘤在裸鼠体内的生长( $1.04 \pm 0.15$  vs  $0.62 \pm 0.16$ ,  $P < 0.01$ ), 提示A-NK细胞膜表面存在IL-4受体的表达。

结论: IL-4能够增强IL-2诱发的A-NK细胞抗肿瘤活性, 此方法在将来肿瘤临床治疗中具有潜在的应用价值。

王志华, 申宝忠, 史历. IL-4增强IL-2活化的A-NK细胞对人直肠癌CC95的抗肿瘤作用. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1375-1377  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1375.asp>

## 0 引言

A-NK细胞(activated natural killer cell)具有独特的生物学特性, 与常规LAK或NK细胞相比有更好的抗肿瘤作用<sup>[1-6]</sup>。目前, 国际上A-NK细胞诱导和活化多采用IL-2单独进行<sup>[7-11]</sup>。我们分别应用IL-2单独或IL-2和IL-4联合诱导A-NK细胞, 观察了该细胞体外细胞毒活性和对直肠裸鼠体内移植瘤的抑制作用。结果提示应用IL-2和IL-4联合诱导的比较IL-2单独诱导的A-NK细胞具有更高的抗肿瘤效果。

## 1 材料和方法

1.1 材料 RPMI1640培养液来自Gibco公司; LDH-L试剂盒从中国科学院上海生化研究所购买; 基因重组白介素2(rIL-2)是卫生部长春生物制品研究所的产品; rIL-4从日本Nipro公司购买; K562, 人红白血病细胞株由日本北海道大学惠赠; 人肺腺癌细胞株(Anip973)和直肠癌细胞株CC95由本所建立; Balb/c裸鼠, ♀, 5-6周龄, 从中国医学科学院动物部获得, 在无病原微生物的洁净条件下实验; RPMI1640培养液含100 mL/L小牛血

清(BCS)用于肿瘤细胞培养; 培养人 A-NK 细胞的 RPMI 1640 加入 100 mL/L 的人 AB 型血清; 两种细胞均在 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养.

1.2 方法 常规分离脾细胞, 用尼龙毛柱法去除单核细胞后, 用含有 100 mL/L 人 AB 血清的 RPMI 1640 调整细胞浓度为  $2 \times 10^8$ /mL. 将细胞悬液分 3 组移至培养板中, 第 1 组, 不加细胞因子, 即脾细胞; 第 2 组, 单独加 IL-2 (500 kU/L) 诱导; 第 3 组, 加入 IL-2 (500 kU/L) 和 IL-4 (500 kU/L) 联合诱导. 连续培养 3 d 后用于实验. 效应细胞的细胞毒性采用 LDH-L 释放测定法. 三种靶细胞(K562, Anip973, CC95, 各  $10^8$ /L)悬液分别加入 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 效应细胞依不同的效靶比例加入.

% 特异溶解 = (实验溶解 cpm - 自发溶解 cpm) / (最大溶解 cpm - 自发溶解 cpm)  $\times$  100 %

将人直肠癌细胞(CC95) 0.1 mL 注射至 Balb/c 裸鼠背部皮下, 动物随机分成 3 组, 每组 5 只. 第 1 组注射脾细胞作为对照; 第 2 组为 IL-2 诱导的 A-NK 细胞; 第 3 组注射 IL-2 和 IL-4 联合诱导的 A-NK 细胞. 第 1, 3, 5 d, 第 2, 3 组的动物分别静脉注射相应的效应细胞 0.2 mL ( $1 \times 10^{10}$ /L), 每 3 d 用卡尺测量肿瘤大小并加以记录.

统计学处理 依实验不同分别采用 t 检验和  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结果

2.1 细胞毒性测定 IL-2 单独或 IL-2 联合 IL-4 都能成功地诱导 A-NK 细胞活性. 由 IL-2 和 IL-4 共同诱发的 A-NK 细胞比 IL-2 单独诱发的 A-NK 细胞的杀伤活性又有显著提高, 对 Anip973 的杀伤率分别为 77.38 % 和 38 %, 对 K562 和 CC95 细胞的杀伤作用与之相似(表 1).

表 1 IL-4 和 IL-2 诱导的 A-NK 细胞体外细胞毒性

效应细胞	诱导条件	特异性溶解 (%)		
		Anip973	K562	CC95
脾细胞		4.43 $\pm$ 0.25	3.25 $\pm$ 0.19	3.76 $\pm$ 0.23
A-NK 细胞	IL-2 单独	39.00 $\pm$ 9.16	43.10 $\pm$ 10.05	42.14 $\pm$ 9.72
A-NK 细胞	IL-2+IL-4	77.68 $\pm$ 12.80 <sup>b</sup>	80.02 $\pm$ 13.74 <sup>b</sup>	79.10 $\pm$ 2.65 <sup>b</sup>

E/T = 40/1, ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ ) <sup>b</sup> $P < 0.01$ , IL-2 单独 vs IL-2+IL-4 联合诱导组.

表 2 IL-4 和 IL-2 诱导 A-NK 细胞对裸鼠人直肠癌 CC95 移植肿瘤 40 d 的抑制作用

组份	肿瘤重量(g)	抑制率(%)
对照组	1.82 $\pm$ 0.11	-
IL2 单独	1.04 $\pm$ 0.15	44.3
IL4+IL-2	0.62 $\pm$ 0.16	66.7 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , IL-2 单独 vs IL-2+IL-4 联合诱导组.

2.2 A-NK 细胞体内抗肿瘤作用 与对照组相比, 用 A-

NK 细胞治疗裸鼠人直肠移植肿瘤 CC95 取得了明显的抑制生长的作用, 并且 2、3 组之间差异显著( $P < 0.01$ , 表 2). 结果提示用 IL-4 和 IL-2 共同诱导能更好地活化 A-NK 细胞增强其抗肿瘤作用.

## 3 讨论

在抗肿瘤免疫中细胞免疫扮演一个重要的角色. 近来很多针对 A-NK 细胞的研究提示与普通 LAK 细胞相比 A-NK 细胞有着更快的扩增速度, 更高的杀伤效果, 由此吸引了大批研究者的广泛关注<sup>[12-16]</sup>. Brunson et al<sup>[17]</sup>曾报告用荧光标记、IL-2 活化的 A-NK 细胞过继转输后能选择性的聚集到建立的肺或肝转移灶内, 结合到肿瘤细胞和 / 或微小血管的内皮细胞上. Smits et al<sup>[18]</sup>指出由于大多数肿瘤细胞表面缺乏 CD18 的表达, A-NK 细胞表面和 CD18 相关的整合素是溶解靶细胞所必须的.

但是如何进一步提高肿瘤生物治疗的作用, 成功的分离, 诱导 A-NK 细胞使之具有较大的抗肿瘤治疗潜力, 增加其疗效是一个不容忽视的课题. 愈来愈多的研究提示不同结构的细胞因子有相似或叠加的生物学活性, 结合应用能够产生累计协同作用, 增加治疗效果同时减少用量, 即达到增效, 减毒的效果<sup>[19-20]</sup>.

直肠癌是临床上常见的恶性肿瘤, 发病率逐年上升, 很多研究表明该病的发生和多种癌基因和抑癌基因的改变有关<sup>[21-33]</sup>. 本研究中, 我们应用 IL-4 和 IL-2 联合或 IL-2 单独诱导 A-NK 细胞在体外取得了抗 K562、Anip973 和 CC95 三种肿瘤细胞的作用, 在裸鼠也成功地抑制了肠癌细胞的生长, 尤其是联合应用的效果更佳, 此结果支持了上述观点, 即联合诱导的效应细胞更加有效.

关于 IL-4 是如何与该细胞的 IL-4 受体结合, 如何触发细胞内的某种结构, 增加 A-NK 细胞的抗肿瘤作用的机制尚未知晓, 该项研究正在进行中.

## 4 参考文献

- Melder RJ, Kristensen CA, Munn LL, Jain RK. Modulation of A-NK cell rigidity: In vitro characterization and in vivo implications for cell delivery. *Biorheology* 2001;38:151-159
- Gu S, Furukawa H, Yamashita A. Observed localization of the long-term cultured rat adherent natural killer cells in mammary tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother* 2000;48:703-713
- Nannmark U, Hokland ME, Agger R, Christiansen M, Kjaergaard J, Goldfarb RH, Bagge U, Unger M, Johansson BR, Albertsson PA, Basse PH. Tumor blood supply and tumor localization by adoptively transferred IL-2 activated natural killer cells. *In Vivo* 2000;14:651-658
- Kim MH, Kitson RP, Albertsson P, Nannmark U, Basse PH, Kuppen PJ, Hokland ME, Goldfarb RH. Secreted and membrane-associated matrix metalloproteinases of IL-2-activated NK cells and their inhibitors. *J Immunol* 2000;164:5883-5889
- Goldfarb RH, Kitson RP, Brunson KW, Yoshino K, Hirota N, Kirii Y, Kotera Y, Inoue Y, Ohashi M. Enhanced anti-metastatic efficacy of IL-2 activated NK (A-NK) cells with novel benzothiazoles. *Anticancer Res* 1999;19:1663-1667
- Hokland M, Kjaergaard J, Kuppen PJ, Nannmark U, Agger R, Hokland P, Basse P. Endogenous and adoptively transferred

- A-NK and T-LAK cells continuously accumulate within murine metastases up to 48 h after inoculation. *In Vivo* 1999;13: 199-204
- 7 Chikamatsu K, Reichert TE, Kashii Y, Saito T, Kawashiri S, Yamamoto E, Whiteside TL. Immunotherapy with effector cells and IL-2 of lymph node metastases of human squamous-cell carcinoma of the head and neck established in nude mice. *Int J Cancer* 1999;82:532-527
- 8 Quintieri L, Rosato A, Amboldi N, Vizler C, Ballinari D, Zanovello P, Collavo D. Delivery of methoxymorpholinyl doxorubicin by interleukin 2-activated NK cells: effect in mice bearing hepatic metastases. *Br J Cancer* 1999;79:1067-1073
- 9 Hagenaaars M, Ensink NG, Jonges LE, Chambers WH, Eggermont AM, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. The development of a bi-specific anti-CD161A x anti-tumor antibody for rat NK cell targeting. *Immunobiology* 1999;200:31-48
- 10 Ribeiro U Jr, Whiteside TL, Basse PH, Safatle-Ribeiro AV, Huneke CE, Posner MC. Activated natural killer cell tumor retention and cytokine production in colon tumor using a tissue-isolated model. *J Surg Res* 1999;82:78-87
- 11 Blom WM, De Bont HJ, Meijerman I, Kuppen PJ, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Interleukin-2-activated natural killer cells can induce both apoptosis and necrosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 1999;29:785-792
- 12 Kitson RP, Appasamy PM, Nannmark U, Albertsson P, Gabauer MK, Goldfarb RH. Matrix metalloproteinases produced by rat IL-2-activated NK cells. *J Immunol* 1999;162:3104
- 13 Hagenaaars M, Ensink NG, Koelemij R, Basse PH, Eggermont AM, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. Regional administration of natural killer cells in a rat hepatic metastasis model results in better tumor infiltration and anti-tumor response than systemic administration. *Int J Cancer* 1998;75: 233-238
- 14 Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:535-544
- 15 Blom WM, de Bont HJ, Meijerman I, Kuppen PJ, van Der Meulen H, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Remodeling of the actin cytoskeleton of target hepatocytes and NK cells during induction of apoptosis. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001;49:78-92
- 16 Koelemij R, Hagenaaars M, Ensink NG, Eggermont AM, Van De Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. Administration of BiMab-retargeted T cells in a rat hepatic metastases colon tumour model results in T-cell tumour infiltration independent of the route of administration. *Scand J Immunol* 2001;53:277-281
- 17 Brunson KW, Ohashi M, Miller CA, Kitson RP, Basse PH, Goldfarb RH. Interleukin-2 (IL-2) activated natural killer (A-NK) cells: binding to microvascular endothelial cells and BRM enhancement of cytolytic activity. *In Vivo* 1994;8:71-75
- 18 Smits KM, Kuppen PJ, Eggermont AM, Tamatani T, Miyasaka M, Fleuren GJ. Ratinterleukin-2-activated natural killer (A-NK) cell-mediated lysis is determined by the presence of CD18 on A-NK cells and the absence of major histocompatibility complex class I on target cells. *Eur J Immunol* 1994;24: 171-175
- 19 Wigginton JM, Lee JK, Wilttrout TA, Alvord WG, Hixon JA, Subleski J, Back TC, Wilttrout RH. Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2. *J Immunol* 2002;169:4467-4474
- 20 Wigginton JM, Gruys E, Geiselhart L, Subleski J, Komschlies KL, Park JW, Wilttrout TA, Nagashima K, Back TC, Wilttrout RH. IFN-gamma and Fas/FasL are required for the antitumor and antiangiogenic effects of IL-12/pulse IL-2 therapy. *J Clin Invest* 2001;108:51-62
- 21 Fan YF, Huang ZH. The study progress of gene therapy in colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:427-430
- 22 Zhang ZS, Zhang YL. The study progress of colorectal cancers in china. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:489-494
- 23 Qu X, Liu JP, Qu H, Su HX. The expression of C-erbB-2 and EGFR in colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9:838-839
- 24 Qu X, Chen J, Lin TH. The prevention of human colorectal cancer LST174 BY monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:841
- 25 Jin YL, Huang PL, Wang YP, Huang ZQ, Wang JD, Meng M. The relation between the mutation of nm23-H1 gene and metastasis of colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001; 9:965-966
- 26 Shen ZX, Cao G, Sun J. The clinical pathological significance of the expression of COX-2mRNA in colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1082-1084
- 27 Tang ZH, Zhou SQ. The DPC4/Smad4 gene and colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1190-1193
- 28 Cai Q, Lu HF, Sun MH, Du X, Fan YZ, Shi DR. Expression of CD44 v3 and v6 protein in human colorectal carcinoma and its relevance with prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000; 8:1255-1258
- 29 Xu SH, Feng JG, Li DC, Mou HZ, Lou RC. Relationship between CD44 in the peripheral blood of patients with colorectal cancer and clinicopathological features. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:432-435
- 30 Guo WJ, Wu HJ, Liu YQ, Zhang WD, Huang WB. The expression of Rasp21 and GST-pi in colorectal adenomas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:104
- 31 Zhou HB, Zhang JM, Yan Y. Inactivation of DPC4 gene in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10: 1140-1142
- 32 Sun Z, Gao HL. Expression of P21ras P16 protein in colorectal carcinoma and its clinical implication. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1399-1403
- 33 Fan RY, Li SR, Wu ZT, Wu X. Detection of P53 protein, K-ras and APC gene mutation in sporadic colorectal cancer tissue and exfoliative epithelial cells in stool. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:771-775

# 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选

刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰

刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所 广东省广州市 510515

刘宇虎, 男, 1963-06-01 生, 四川省越西县人, 博士生, 副主任医师。

国家自然科学基金项目, No. 30171053

项目负责人: 张振书, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所. zhangzs@fimmu.edu.cn

电话: 020-61641561

收稿日期: 2002-12-08 接受日期: 2002-12-25

## Screening of human colorectal carcinoma associated antigen genes by SEREX

Yu-Hu Liu, Zhen-Shu Zhang, Dong Zhong, Jin-Bao Wu, Han-Lei Dan, Zhuo-Sheng Lai, Ya-Dong Wang, Ya-Li Zhang, Bing Xiao

Yu-Hu Liu, Zhen-Shu Zhang, Dong Zhong, Jin-Bao Wu, Han-Lei Dan, Zhuo-Sheng Lai, Ya-Dong Wang, Ya-Li Zhang, Bing Xiao, Institute for Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30171053

Correspondence to: Zhen-Shu Zhang, Institute for Digestive Disease of PLA, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. zhangzs@fimmu.edu.cn  
Received: 2002-12-08 Accepted: 2002-12-25

## Abstract

AIM: To screen and identify the human colorectal carcinoma associated antigen genes.

METHODS: Three human colorectal carcinoma cDNA phage expression libraries were constructed. They were screened from autologous and allogeneic sera of colorectal cancer patients by SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning). The sera were pre-absorbed by the extract *E. coli* XL1-blue. Four different serum-reactive cDNA clones were isolated by immunoscreening from a colon cancer-derived cDNA expression library. Positive clones were amplified by plate culture, the purified lambda phage DNA was cut by *Sfi* I restriction endonucleases and amplified with PCR in order to identify the insert size of cDNA by electrophoresis.

RESULTS: Three cDNA phage expression libraries were constructed. The titer of library was  $2.39 \times 10^6$  nfu/L,  $2.07 \times 10^6$  nfu/L and  $1.86 \times 10^6$  nfu/L respectively. The range of the fragment length of exogenously inserted cDNA was between 0.5-4 kb, the average was 1.4 kb, 1.6 kb and 1.3 kb, respectively. Four gene clones were obtained by SEREX screening, the length of their insert fragments was 2.4 kb, 1.8 kb, 2.3 kb and 2.2 kb, respectively.

CONCLUSION: To screen and identify human colorectal carcinoma cDNA phage expression libraries by SEREX is a

useful method to search for human colorectal carcinoma associated antigen genes. It is important for early diagnosis and research of recombinant vaccine for colorectal cancer.

Liu YH, Zhang ZS, Zhong D, Wu JB, Dan HL, Lai ZS, Wang YD, Zhang YL, Xiao B. Screening of human colorectal carcinoma associated antigen genes by SEREX. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1378-1381

## 摘要

目的: 寻找人源性大肠癌相关抗原基因。

方法: 构建 3 个以  $\lambda$  Tripl Ex2 噬菌体作载体的大肠癌抗原 cDNA 表达文库, 用自体或异体大肠癌患者血清应用 SEREX 方法进行免疫筛选。用平板法扩增阳性克隆噬菌体, 提取纯化 DNA, 用 *Sfi* I 酶切和 PCR 鉴定插入片段的大小。

结果: 构建成 3 个大肠癌抗原 cDNA 噬菌体表达文库, 滴度分别为  $2.39 \times 10^6$  nfu/L,  $2.07 \times 10^6$  nfu/L 和  $1.86 \times 10^6$  nfu/L, 插入片段长度为 0.5-4 kb, 平均分别为 1.4 kb, 1.6 kb 和 1.3 kb。筛选发现 4 个阳性克隆, 插入 cDNA 片段大小分别为 2.4 kb, 1.8 kb, 2.3 kb 和 2.2 kb。

结论: 用 SEREX 方法筛选大肠癌抗原 cDNA 表达文库, 可获得有价值的大肠癌的重组抗原基因克隆, 将有利于大肠癌的早期诊断和重组疫苗的研究。

刘宇虎, 张振书, 钟东, 武金宝, 但汉雷, 赖卓胜, 王亚东, 张亚历, 肖冰. 人源性大肠癌抗原基因的 SEREX 筛选. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1378-1381  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1378.asp>

## 0 引言

cDNA 文库的应用, 为分离肿瘤抗原基因奠定了基础。重组克隆表达抗原的血清学鉴定技术 (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression libraries. SEREX) 可直接鉴定肿瘤抗原。不需要特异 CTL 和瘤细胞的体外建株, 应用 cDNA 表达文库使抗原浓度成百倍的增加, 解决了既往肿瘤抗原抗体反应中的关键问题, 发现了大量的肿瘤抗原。我们用 SEREX 方法筛选人源性大肠癌 cDNA 噬菌体表达文库, 期能发现新的大肠癌相关基因。

## 1 材料和方法

1.1 材料 南方医院普外科大肠癌患者手术的新鲜癌组织 3 例; 大肠杆菌 *E. coli* XL1-blue 和噬菌体载体  $\lambda$  TriplEx2



购自Clontech公司; Trizol试剂购自Gibco公司; SMART<sup>TM</sup> cDNA library on struction kit购自Clontech; Expand<sup>TM</sup> reverse transcriptase购自宝灵曼公司; MaxPlax<sup>TM</sup> packaging extract kit 购自Epicentre公司; 硝酸纤维素膜(NC膜)购自Pall Corp; 碱性磷酸酶标记的羊抗人IgG抗体为Southern Biotechnology Associates, Inc; BCIP和NBT购自BBI公司; EX Tag<sup>TM</sup> extru<sup>e</sup>酶购自TaKaRa; Sfi I酶购自NEB; 琼脂糖购自Gibco; 1 kb DNA ladder marker 购自NEB; 100 bp DNA ladder marker 购自MBI; Lambda DNA/Hind III marker 购自Promega; Orbital shaker incubator RKC CB700 摇床; Shaking bath SB-16 Techne摇床; UNO II Biometra 960型PCR仪; Sigma 3K-30 台式冷冻高速离心机; Vilber Lourmat 凝胶图像分析仪.

1.2 方法 用Trizol LS reagent 试剂裂解组织并提取总RNA, 用RT-PCR合成cDNA第1链, 用LD-PCR合成cDNA第2链, 在蛋白酶K消化, Sfi I酶切后, 用Chroma Spin-400分离去除小于500bp的小片段, 与λ TriplEx2噬菌体载体连接, 体外包装, 构建成大肠癌抗原噬菌体cDNA表达文库. 取1支50 mL培养管, 加入15 mL含硫酸镁的LB, 加入四环素终浓度为15 mg/L. 挑选1个单个孤立的E.coli XL1-blue菌落加入, 37℃, 200 r/min摇床孵育6-8 h至A<sub>600</sub>=2.0. 取0.5-1 mL菌液加入另1支有15 mL含硫酸镁、麦芽糖和四环素的LB 50 mL培养管, 37℃, 200 r/min摇床孵育4-6 h至对数生长期A<sub>600</sub>=0.6-0.8. 5 000 r/min, 离心10 min, 弃上清, 用10 mmol/L硫酸镁7.5 mL重悬细菌沉淀, 制备成感受态菌液, 4℃冰箱存放. 按1:200接种于含硫酸镁、四环素的1 000 mL LB中, 37℃, 200 r/min振荡生长至饱和. 4℃, 4 000 r/min, 离心10 min, 沉淀细胞重悬于10 mL PBS中, 经超声粉碎制成E.coli XL1-blue裂解液. 每1 mL血清加8 mL裂解液, 于4℃摇床50 r/min振荡过夜. 4℃, 4 000 r/min, 离心10 min, 收集上清. 再用同样方法、同等量裂解液重复吸收3次, 制成血清预吸收液, 4℃冰箱存放. 取文库1 μL加入感受态菌液200 μL, 37℃孵育15 min, 使噬菌体黏附于细菌. 加入3 mL溶化冷却到48℃的含硫酸镁的LB顶层软琼脂, 混匀, 倒入预热到37℃底层硬琼脂90 mm平板中, 迅速涡旋铺平. 室温冷却10 min, 正立37℃孵育30 min, 倒置37℃孵育12-18 h. 见噬菌斑生长如针尖大小, 用平头镊将预先高压灭菌, 用20 mmol/L IPTG浸泡4 h, 室温自然干燥的NC膜平铺于平皿上, NC膜边缘不对称标记, 贴膜后42℃诱导4 h, 以使转移到NC膜的噬菌斑能充分诱导其融合蛋白形成. 小心将NC膜从平板上剥离取出, 放于湿润的纸巾上, 旁边放一装有氯仿的无盖平皿, 用一塑料罩将NC膜和平皿罩住15-20 min, 以固定NC膜. 平皿4℃保存, 以备挑出阳性克隆. 将NC膜迅速浸泡于大量1×TNT缓冲液中, 室温轻摇, 洗涤3次, 每次10 min, 以去除残存的琼脂. 将NC膜置于20 mL用TBST配制的100 g/L

脱脂奶粉的封闭液中, 室温轻摇90 min. 1×TNT缓冲液洗涤3次, 每次10 min. 将NC膜移入用PBS 1:50或1:100稀释的已预吸收的大肠癌患者血清中, 4℃轻摇过夜. 1×TNT缓冲液洗涤3次, 每次10 min. 将NC膜置于1:800稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗人IgG抗体中, 室温轻摇60 min. 1×TNT缓冲液洗涤3次, 每次10 min. 凉干后, 置于含NBT 33 μL和BCIP 16.5 μL的碱性磷酸酶缓冲液中, 显色30 min. 阳性克隆进行第二轮和第三轮筛选. 阳性克隆采用平板法扩增噬菌体, 用消毒牙签挑选阳性噬斑, 置于装有1 mL 1×L.D.B溶液(噬菌体稀释液)的1.5 mL EP管内, 加入25 μL氯仿, 涡旋2 min, 于4℃放置过夜. 取50-100 μL噬菌体悬液加入500 μL感受态菌液, 用150 mm平板扩增噬菌体, 37℃孵育12-18 h或到噬斑相互融合止. 加入12 mL不含明胶的1×L.D.B, 4℃过夜. 平板室温, 50 r/min摇床1 h. 收集洗涤液到另一支50 mL离心管中. 用Qiagen公司试剂盒提取、纯化阳性克隆噬菌体DNA, 最后用50 μL pH8.0的TE溶解. 用NEB公司的Sfi I酶切50℃2 h. 用TaKaRa公司的EX Tag<sup>TM</sup> extru<sup>e</sup>做PCR, 上游引物: 5'-TCCGAGATCTG GACGAGC-3' 下游引物: 5'-CCCTATAGTGAGTCGTA TTA-3' 条件: 94℃ 30 s, 58℃ 60 s, 72℃ 2 min, ×35循环. 用10 g/L琼脂糖凝胶, 1×TAE缓冲液, 60 V, 60 min电泳, 观察片段的大小.

## 2 结果

2.1 cDNA文库的质量鉴定 成功构建成3个大肠癌抗原cDNA噬菌体表达文库, 滴度分别为 $2.39 \times 10^6$  nfu/L,  $2.07 \times 10^6$  nfu/L和 $1.86 \times 10^6$  nfu/L. 重组率分别为97.5%, 98.6%和98.5%. 插入外源cDNA片段大小范围从0.5-4 kb, 平均分别为1.4 kb, 1.6 kb和1.3 kb. 符合建库要求, 适合于大批量筛选cDNA克隆的大肠癌特异或相关抗原基因.

2.2 筛选阳性克隆 噬菌斑转移到NC膜上, 经显色反应后, 背景呈浅紫色, 阴性噬菌斑与背景相似, 有淡的噬菌斑影, 阳性的噬菌斑呈深蓝色. 图1为NC膜上复筛的阳性克隆.

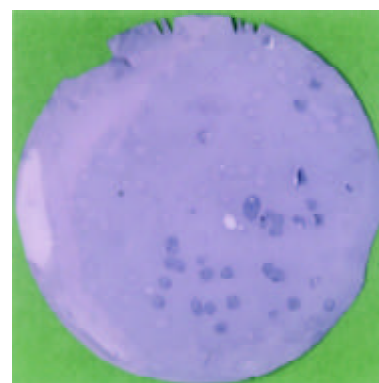
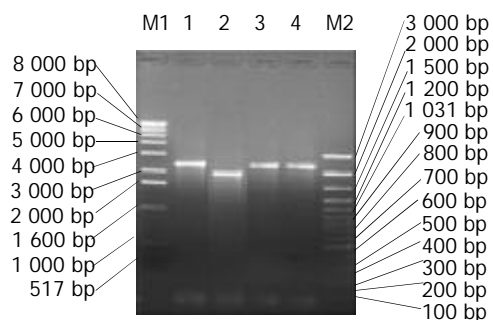


图1 SEREX筛选的阳性克隆(蓝色噬菌斑).

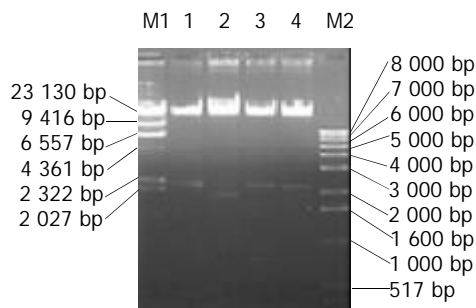
2.3 阳性克隆Sfi I酶切和PCR鉴定 通过对3个cDNA

噬菌体表达文库进行筛选, 获得4个阳性克隆, 扩增后提取纯化DNA, 用Sfi I 酶切和PCR鉴定, 分别为2.4 kb, 1.8 kb, 2.3 kb和2.2 kb(图2, 3).



M1: 1 kb DNA ladder marker; M2: 100 bp DNA ladder marker;  
1-4: 4个阳性克隆cDNA片段的大小.

图2 阳性克隆外源插入cDNA片段的PCR鉴定.



M1: Lambda DNA Hind III marker; M2: 1 kb DNA ladder marker;  
1-4: 4个阳性克隆cDNA片段的大小.

图3 阳性克隆外源插入cDNA片段的Sfi I 酶切结果.

### 3 讨论

目前国内研究大肠癌基因表达较多<sup>[1-26]</sup>, 而很少有人构建大肠癌抗原基因cDNA表达文库<sup>[27]</sup>以寻找大肠癌相关基因. 用血清免疫学方法筛选cDNA文库(SEREX)是近来发现的获取特异性基因克隆的分子生物学技术, 是应用于重组疫苗和诊断抗原研究的一种有效方法. 应用SEREX技术在大肠癌已发现较多新基因. Scanlan et al<sup>[28]</sup>发现48个抗原NY-CO-1-NY-CO-48, 17个为新基因, NY-CO-13为p53肿瘤抑制基因的突变体, NY-CO-27主要在胃肠道表达, 为组织特异性的亚型, 有半数患者的血清发生反应. Hampton et al<sup>[29]</sup>发现2个癌基因专宿白血病病毒包膜蛋白(env)抗原和鼠ATRX蛋白抗原, env代表2个未突变的肿瘤抗原, 其DNA多核苷酸编码的env多肽在小鼠体内引起强烈而特异的免疫反应. Line et al<sup>[30]</sup>发现5个基因, RHAMM和AD034基因有不同的组织表达. NAP1L1, RHAMM和AD034基因只在肿瘤组织中表达. AD034的序列与酪氨酸激酶的基序移码插入32 bp的位点是肿瘤分化的cDNA隐含的剪接位点. RHAMM cDNA序列有2个剪接变异, 有2个亚细胞位点. 多数患者的血清对C21ORF2、EPRS和NAP1L1有反应. Somers et al<sup>[31]</sup>发现13抗原基因, 1个新基因, 与HSPC218同源, 可作为肿瘤疫苗候选基因及诊断与预后的标记物.

肿瘤抗原的鉴定不仅有助于阐明肿瘤免疫分子机制, 也是建立新的肿瘤免疫学诊断和防治方法的基础. 大多数人类肿瘤可表达若干种具有免疫原性的蛋白质, 但只有那些具有特异性或有一定优势的抗原(如CT抗原)可用于制备疫苗. 选择在组织限制性mRNA表达和肿瘤限制性免疫原性两个方面最有意义的抗原做进一步的研究. 由于肿瘤抗原同时存在特异性的体液免疫和细胞免疫, 其所揭示的T细胞和B细胞双识别肿瘤抗原现象, 广泛存在于肿瘤患者中. 用肿瘤特异的T淋巴细胞识别肿瘤抗原的多肽, 产生多价疫苗, 是肿瘤基因疫苗的一个策略. Okada et al<sup>[32]</sup>进行肿瘤疫苗治疗的结果表明, 临床有望开展肿瘤的疫苗治疗. SEREX所鉴定的肿瘤抗原除可作为制备肿瘤疫苗的对象外, 还可作为大范围人群血清学调查, 肿瘤临床诊断以及肿瘤疫苗临床疗效监测的指标. 对大肠癌抗原基因的筛选, 对阳性克隆进一步做序列分析和生物活性鉴定, 可望对大肠癌的病因学、诊断、治疗有突破性的进展.

### 4 参考文献

- Zhou HB, Zhang JM, Yan Y. Inactivation of DPC<sub>4</sub> gene in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:1140-1142
- Xiao DS, Wen JF, Li JH, Hu ZL, Zheng H, Fu CY. Effect of transfected DPC4 gene on biological behaviours of human colorectal carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:1004-1008
- Zhou XD, Yu JP, Ran ZX, Luo HS, Yu BP. Expression of cFLIP and p53 mutation in adenocarcinoma of colon. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:536-539
- Guo J, Shen ZX, Tan SY, Luo HS, Li HX, Feng ZQ, Yang J. Expression of MDM2, P53 and P14ARF in human colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:540-543
- Xiang DB, Wu XH, Li ZP, Liu YS. Expression of  $\beta$ -catenin, cyclin D1 and c-myc in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:305-308
- Yu LL, Yu JP, Ran ZX, Yu HG. Relationship between nuclear factor-kappa B, apoptosis and proliferation in colorectal neoplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:309-312
- Fang XM, Yu JP, Luo HS. Relationship between hTERT and P16 gene expressions and telomerase activity in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:12-14
- Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25
- Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8:270-275
- Xiong B, Gong LL, Zhang F, Hu MB, Yuan HY. TGF  $\beta_1$  expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue. *World J Gastroenterol* 2002;8:496-498
- Zhou CZ, Peng ZH, Zhang F, Qiu GQ, He L. Loss of heterozygosity on long arm of chromosome 22 in sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:668-673
- Xiong B, Yuan HY, Hu MB, Zhang F, Wei ZZ, Gong LL, Yang GL. Transforming growth factor- $\beta_1$  in invasion and metastasis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:674-678
- Fan RY, Li SR, Wu ZT, Wu X. Detection of P53 protein, K-ras and APC gene mutation in sporadic colorectal cancer tissue and exfoliative epithelial cells in stool. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:771-775
- Li XW, Ding YQ, Cai JJ, Yang SQ, An LB, Qiao DF. Studies on mechanism of Sialy Lewis-X antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:425-430

- 15 Zheng CX, Zhan WH, Zhao JZ, Zheng D, Wang DP, He YL, Zheng ZQ. The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:431-434
- 16 Li XG, Song JD, Wang YQ. Differential expression of a novel colorectal cancer differentiation-related gene in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:551-554
- 17 Yi J, Wang ZW, Cang H, Chen YY, Zhao R, Yu BM, Tang XM. P16 gene methylation in colorectal cancers associated with Duke's staging. *World J Gastroenterol* 2001;7:722-725
- 18 Luo MJ, Lai MD. Identification of differentially expressed genes in normal mucosa, adenoma and adenocarcinoma of colon by SSH. *World J Gastroenterol* 2001;7:726-731
- 19 Cai Q, Lu HF, Sun MH, Du X, Fan YZ, Shi DR. Expression of CD44 v3 and v6 proteins in human colorectal carcinoma and its relevance with prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1255-1258
- 20 Gu HP, Ni CR, Zhan RZ. Relationship of expressions of CD15, CD44v6 and nm23H1 mRNA with metastasis and prognosis of colon carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:887-891
- 21 Liu H, Wu JS, Li LH, Yao X. The expression of platelet-derived growth factor and angiogenesis in human colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:661-664
- 22 Ji DJ, Cao Y, Zhang YL, Jiang P, Yu N, Feng FC, Zhou DY. Synchronous studies on variations of p53 gene transcriptions and expressions in colorectal carcinomas HT-29 and Lovo cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:77-79
- 23 Wu BP, Zhang YL, Zhou DY, Gao CF, Lai ZS. Microsatellite instability, MMR gene expression and proliferation kinetics in colorectal cancer with familial predisposition. *World J Gastroenterol* 2000;6:902-905
- 24 Wang Q, Wu JS, Lai DN, Ma QJ, Pan BR. Expression and significance of P16 protein in colorectal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1047-1048
- 25 Qiao Q, Wu JS, Zhang J, Ma QJ, Lai DN. Expression and significance of apoptosis related gene bcl-2, bax in human large intestine adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:936-938
- 26 Zhang LL, Zhang ZS, Zhang YL, Wu BP, Guo W, Liu XX, Zhou DY. Microsatellite instability in multiple primary colorectal cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:397-399
- 27 Guo JM, Xiao BX, Luo CQ. The establishment of subtractive cDNA libraries of differentially expressed genes between colon cancer cells and their induced cells. *J NingBo University (NSEE)* 2001;14:102-106
- 28 Scanlan MJ, Chen YT, Williamson B, Gure AO, Stockert E, Gordan JD, Tureci O, Sahin U, Pfreundschuh M, Old LJ. Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J Cancer* 1998;76:652-658
- 29 Hampton TA, Conry RM, Khazaeli MB, Shaw DR, Curiel DT, LoBuglio AF, Strong TV. SEREX analysis for tumor antigen identification in a mouse model of adenocarcinoma. *Cancer Gene Ther* 2000;7:446-455
- 30 Line A, Slucka Z, Stengrevics A, Silina K, Li G, Rees RC. Characterisation of tumour-associated antigens in colon cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:574-582
- 31 Somers VA, Brandwijk RJ, Joosten B, Moerkerk PT, Arends JW, Menheere P, Pieterse WO, Claessen A, Scheper RJ, Hoogenboom HR, Hufton SE. A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library. *The J Immunol* 2002;169:2772-2780
- 32 Okada H, Attanucci J, Giezeman-Smits KM, Brissette-Storkus C, Fellows WK, Gambotto A, Pollack LF, Pogue-Geile K, Lotze MT, Bozik ME, Chambers WH. Immunization with an antigen identified by cytokine tumor vaccine-assisted SEREX (CAS) suppressed growth of the rat 9L glioma in vivo. *Cancer Res* 2001;61:2625-2631

# 直肠癌组织CD44v6, DNA含量的联合检测及临床意义

丁志杰, 单吉贤, 都姝妍

丁志杰, 单吉贤, 中国医科大学附属第一医院肿瘤科 辽宁省沈阳市 110001  
都姝妍, 中国医科大学附属第一医院中心实验室 辽宁省沈阳市 110001  
丁志杰, 男, 1966-06-03 生, 辽宁省辽中县人, 汉族. 1990 年中国医科大学  
本科毕业, 医学博士, 副主任医师, 主要从事消化道肿瘤的临床研究.  
项目负责人: 丁志杰, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国  
医科大学附属第一医院肿瘤科. zhijieding@sina.com  
电话: 024-23256666-6227  
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-25

## Simultaneous detection of CD44v6 expression and DNA content in rectal cancer and its clinical significance

Zhi-Jie Ding, Ji-Xian Shan, Shu-Yan Du

Zhi-Jie Ding, Ji-Xian Shan, Department of Oncology, First Hospital of  
China Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province, China  
Shu-Yan Du, Department of center laboratory, First Hospital of China  
Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Zhi-Jie Ding, Department of Oncology, First Hos-  
pital of China Medical University, Shenyang, 110001, Liaoning Province,  
China. zhijieding@sina.com  
Received: 2002-11-29 Accepted: 2002-12-25

## Abstract

AIM: To explore CD44v6 expression and DNA content and the ir significance in the progress of rectal cancer.

METHODS: In 40 cases of rectal cancer and 10 cases of normal intestinal tissues, CD44v6 expression and DNA content were detected simultaneously by flow cytometry.

RESULTS: The CD44v6 expression and DNA content in rectal cancer were significantly higher than those in normal tissue (70 % vs 0 %,  $1.11 \pm 0.6$  vs  $0.9 \pm 0.65$ ,  $P < 0.01$ ). The positive expression of CD44v6 was closely related to the depth of invasion (0 % vs 50 % vs 80 % vs 100 %,  $P < 0.05$ ) lymphnode metastasis (93.3 % vs 56.0 %,  $P < 0.05$ ) and Dukes stage (56.0 % vs 93.3 %,  $P < 0.05$ ). The DNA aneuploidy in cancer was also related to lymph node metastasis (100 % vs 68 %,  $P < 0.05$ ) and Duke's stage (68 % vs 100 %,  $P < 0.05$ ). The expression of CD44v6 did not show any correlation with DNA ploidy of tumor cells (85.7 % vs 68.7 %,  $P > 0.05$ ).

CONCLUSION: The abnormal expression of CD44v6 and DNA aneuploidy plays an important role in the development, invasion and metastasis of rectal cancer. The detection of CD44v6 and DNA content simultaneously may serve as a useful indicator to predict progress of tumor and lymph node metastasis.

Ding ZJ, Shan JX, Du SY. Simultaneous detection of CD44v6 expres-  
sion and DNA content in rectal cancer and its clinical significance.  
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1382-1384

## 摘要

目的: 探讨直肠癌CD44v6表达情况和DNA含量及其临床意义.

方法: 应用流式细胞术同时检测40例直肠癌及10例正常组织中CD44v6表达量和DNA含量.

结果: 直肠癌中CD44v6表达量和DNA含量均显著高于正常组织(70 % vs 0 %,  $1.11 \pm 0.6$  vs  $0.9 \pm 0.65$ ,  $P < 0.01$ ), 肿瘤组织中CD44v6阳性表达与直肠癌浸润深度(0 % vs 50 % vs 80 % vs 100 %)、淋巴结转移(93.3 % vs 56.0 %)及Dukes分期(56.0 % vs 93.3 %)有关( $P < 0.05$ ); DNA异倍体与淋巴结转移(100 % vs 68 %)及Dukes分期(68 % vs 100 %)有关( $P < 0.05$ ). CD44v6表达与肿瘤细胞DNA倍体无关(85.7 % vs 68.7 %,  $P > 0.05$ ).

结论: CD44v6表达异常及DNA倍体异常在直肠癌进展和浸润转移中起作用, 联合检测CD44v6和DNA倍体可作为预测直肠癌进展程度、淋巴结转移有用的指标.

丁志杰, 单吉贤, 都姝妍. 直肠癌组织CD44v6, DNA含量的联合检测及临床意义. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1382-1384

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1382.asp>

## 0 引言

CD44 为细胞黏附分子, 存在于多种恶性肿瘤中, 其多种变异拼接体特别是CD44v6的表达与肿瘤转移复发有密切关系. DNA含量异常是恶性肿瘤的特征性改变之一, 能反映肿瘤的生物学特性, 我们采用流式细胞术联合检测 40 例直肠癌中 CD44v6 的表达及 DNA 含量, 探讨二者在直肠癌发生发展及转移中的意义.

## 1 材料和方法

1.1 材料 直肠癌手术标本 40 例, 男 13 例, 女 27 例, 平均年龄 61 岁. 所有病例均经组织病理学证实. 另取 10 例癌远端正常肠组织作为对照组.

1.2 方法 取新鲜标本, 用眼科剪刀剪碎, 细胞悬液经 400 目尼龙网过滤, PBS 冲洗离心, 去上清后调整细胞数为  $1 \times 10^9/L$ , 加入 FITC 标记的小鼠抗人 CD44v6 单克隆抗体 VFF-18 (Benoler Medsystem, 1 : 20), 另一管加入阴性对照 FITC 标记的小鼠 IgG1(Becton Dickinson, 1 : 20), 4 °C, 避光 30 min, 0.01 mol/L PBS 冲洗离心后加 10 g/L 多聚甲醛固定 5 min, 离心后加入 PI 染色液(PI 5 mg, RNase 2 mg, Triton X-100 1 mL, 枸

橡酸钠 100 mg, 0.01mol/L PBS 65 mL, 加蒸馏水至 100 mL; pH7.2-7.6 )1 mL, 4 °C, 避光 30 min 后上机检测. 流式细胞仪为 FACscan (Becton Dickinson), 200 mW 氩激光(488 nm), 同时检测 PI 红色荧光(DNA)和 FITC 绿色荧光(CD44v6)信号, 采集 10 000 个细胞, 所测数据用 Cellquest 软件处理. 以 DNA 指数(DNA index, DI)判断 DNA 含量, 用正常人体周围血淋巴细胞 DNA 含量作为参考标准, 公式为:  $DI = (\text{样品 } G_0/G_1 \text{ 期 DNA 量平均值}) / (\text{标准二倍体 DNA 量平均值})$ .  $DI = 1.0 \pm 0.1$  为二倍体肿瘤,  $DI \neq 1.0 \pm 0.1$  为异倍体肿瘤. 以荧光指数 (fluorescence index, FI) 表示 CD44v6 的相对含量, 公式为:  $FI = (\text{癌组织 CD44v6 平均荧光强度} - \text{对照组平均荧光强度}) / \text{正常组织中 CD44v6 平均荧光强度}$ , 如  $FI > 2.0$  为 CD44v6 阳性,  $FI < 2.0$  为阴性.

统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件对计量资料进行 t 检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

癌组织中 CD44v6 的表达量及 DNA 含量均显著高于正常组织(表 1 和图 1-4), 40 例直肠癌中, CD44v6 阳性率为 70 % (28/40), 异倍体检出率为 80 % (32/40). CD44v6 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及 Dukes 分期有关( $P < 0.05$ ), 和大体类型、生长方式及病理类型无关. DNA 异倍体也与淋巴结转移及 Dukes 分期有关( $P < 0.05$ ), (表 2). 在 CD44v6 阳性的 28 例标本中, 异倍体 24 例(85.7 %), CD44v6 阴性的 12 例中, 异倍体 8 例(68.7 %), 二者经统计学处理, 无显著性差异( $\chi^2 = 0.9$ ,  $P > 0.05$ ).

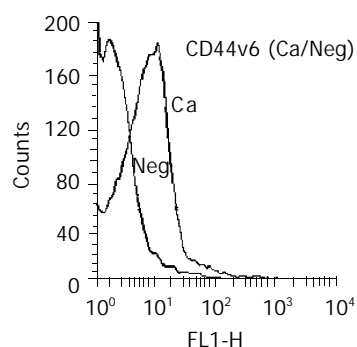


图 1 示同一癌组织内实验管(Ca) CD44v6 表达量明显高于对照管(Neg).

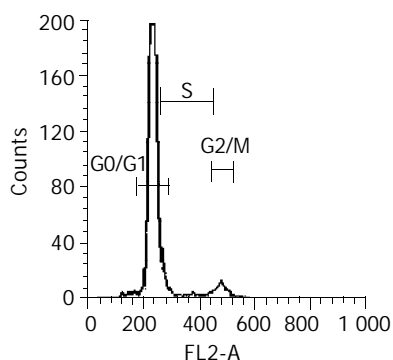


图 2 示正常癌旁组织 DNA 直方图 未见异倍体峰.

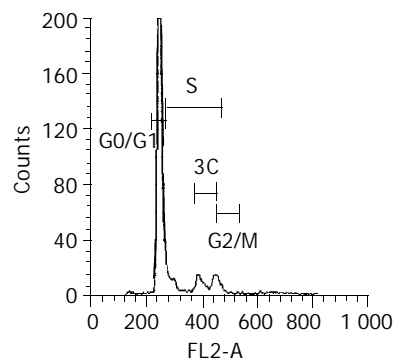


图 3 示癌组织 DNA 直方图出现三倍体峰(3C).

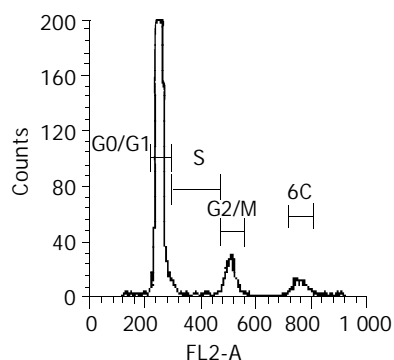


图 4 示癌组织 DNA 直方图出现六倍体峰(6C).

表 1 直肠组织中 CD44v6 和 DNA ( $\bar{x} \pm s$ )

组织	n	FI	CD44v6 阳性率 / %	DI	异倍体率 / %
癌	40	$2.68 \pm 1.48^b$	70 <sup>b</sup>	$1.11 \pm 0.60^a$	80 <sup>b</sup>
正常	10	$0.55 \pm 0.16$	0	$0.90 \pm 0.65$	0

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 正常; <sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 正常.

表 2 CD44v6、DNA 倍体与临床病理因素关系

病理因素	n	CD44v6 阳性率 / %	DNA 异倍体率 / %
大体类型 隆起型	11	8 (72.7)	10 (90.91)
溃疡型	29	20 (69.0)	22 (75.9)
生长方式 团块状	29	20 (69.0)	22 (75.9)
巢状	11	8 (72.7)	10 (90.9)
病理类型 高分化腺癌	19	12 (63.2)	15 (79.0)
中分化腺癌	7	6 (85.7)	5 (71.4)
低分化腺癌	2	1 (50.0)	2 (100.0)
乳头状腺癌	9	7 (77.8)	7 (77.8)
黏液腺癌	3	2 (66.7)	3 (100.0)
浸润深度 黏膜层	1	0	0
肌层	12	6 (50.0)	9 (75.0)
浆膜下	25	20 (80.0)	21 (84.0)
浆膜外	2	2 (100.0) <sup>a</sup>	2 (100.00)
淋巴结转移 有	15	14 (93.3)	15 (100.0)
无	25	14 (56.0) <sup>a</sup>	17 (68.0) <sup>a</sup>
Dukes 分期 A/B	25	14 (56.0)	17 (68.0)
C/D	15	14 (93.3) <sup>a</sup>	15 (100.0) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 组内比较.



### 3 讨论

肿瘤侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的生物学特性,肿瘤侵袭转移涉及多个环节,其中肿瘤细胞表面的黏附分子起着重要作用。CD44v6作为黏附分子CD44的变构体,通过迁移,外渗,增生等形式赋予肿瘤细胞转移潜能<sup>[1]</sup>。研究表明CD44v6可能影响大肠癌细胞骨架肌动蛋白的分布,聚合,解聚的过程来增强癌细胞运动能力,促使其容易发生转移<sup>[2]</sup>。认为CD44v6表达是大肠癌细胞形成的特征性变化,与癌细胞穿透肠壁有关<sup>[3]</sup>。目前关于CD44v6在大肠癌发生发展过程中作用尚存在分歧。部分学者认为CD44v6绝大部分表达于腺瘤、腺癌中,与大肠癌发生有关,与反映肿瘤进展的临床病理因素及预后无关<sup>[3-7]</sup>。另外一些研究则表明CD44v6不仅与肿瘤分化程度、Dukes分期、淋巴结转移有关<sup>[8, 9]</sup>,而且与肝转移、术后复发及生存率有关<sup>[10-13]</sup>,认为CD44v6是大肠癌转移相关因子。我们采用流式细胞术可定量检测肿瘤中CD44v6表达情况,结果表明癌组织CD44v6表达程度显著高于正常组织,CD44v6表达阳性率为70%(28/40),而正常组织中未见CD44v6表达。40例肿瘤组织中CD44v6阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及Dukes分期有关( $P < 0.05$ ),与大体类型、生长方式及病理类型无关,此结果与国内外报道基本一致<sup>[8, 9, 14, 15]</sup>,提示CD44v6与直肠癌发生发展及转移有关。尤其是淋巴结阳性及肿瘤侵袭浆膜组中CD44v6阳性表达率明显高于淋巴结阴性及肿瘤局限于黏膜下或肌层,从而在基因水平上证实了CD44v6与直肠癌局部浸润远处转移高度相关。

恶性肿瘤组织基本生物学特性是肿瘤细胞处于无限分裂增生状态,表现为DNA含量的异常改变,呈现异倍体状态。异倍体作为一种遗传不稳定形式,有可能提高肿瘤细胞产生异质性的能力<sup>[16]</sup>,因此DNA倍体状况是反映大肠癌生物学行为重要因素<sup>[17]</sup>。许多研究表明大肠癌细胞中不仅DNA倍体异常,而且其DNA倍体形式和细胞周期增生指数还与肿瘤大小、分期、淋巴结转移、血管侵袭以及预后有关<sup>[18-20]</sup>。本组资料中,40例肿瘤标本中32例检出异倍体,异倍体率(80%)显著高于正常组织,统计分析还表明肿瘤异倍体与淋巴结转移及Dukes分期有关,低分化腺癌和黏液腺癌中异倍体率达100%,高于高、中分化腺癌(76.7%),肿瘤侵犯浆膜下或浆膜者异倍体率也较局限于黏膜下或肌层者高,但二组均无显著性差异。结果提示肿瘤细胞DNA倍体与肿瘤转移有关,异倍体肿瘤较二倍体肿瘤更容易发生淋巴结转移,病期偏晚,预后较差。本实验结果还表明CD44v6阳性者中异倍体率(85.7%)与CD44v6阳性者中异倍体率(66.7%)无显著性差异,说明CD44v6的表达与肿瘤细胞DNA倍体无关,各自为一个独立的预后影响因素。

### 4 参考文献

1 Clarke G, Ryan E, O'Keane JC, Crowe J, Mathuna PM. Mor-

- talities association of enhanced CD44v6 expression is not mediated through occult lymphatic spread in stage II colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1028-1031
- 2 Li Z, Ding Y, Deng Y. Mechanism of CD44v6 in human colorectal carcinoma metastasis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1998;78:729-732
- 3 Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today* 2000;30:28-32
- 4 Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, Cantor AB, Karl R, Marcet J, Cooper DL, Nicosia SV, Cooper HS. CD44v6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 1998;29:627-635
- 5 Gu J, Zhu X, Ye Y, Qu J, Huang L, Li R, Yu Y, Leng X. The level of expression of adhesion molecules CD44v6 and E-cadherin in colorectal cancer and analysis of correlates with metastasis. *Zhonghua Waikao Zazhi* 1999;37:108-109
- 6 Junglin B, Menges M, Goebel R, Wittig BM, Weg-Remers S, Pistorius G, Schilling M, Bauer M, Konig J, Zeitz M, Stallmach A. Expression of CD44v6 has no prognostic value in patients with colorectal cancer. *Z Gastroenterol* 2002;40:229-233
- 7 Morrin M, Delaney PV. CD44v6 is not relevant in colorectal tumour progression. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:30-36
- 8 Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lippinen PK, Alhava E, Kosma VM. Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:301-309
- 9 Masson D, Denis MG, Lustenberger P. Limitations of CD44v6 amplification for the detection of tumour cells in the blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000;82:1283-1289
- 10 Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 1999;56:232-238
- 11 Nanashima A, Yamaguchi H, Sawai T, Yasutake T, Tsuji T, Jibiki M, Yamaguchi E, Nakagoe T, Ayabe H. Expression of adhesion molecules in hepatic metastases of colorectal carcinoma: relationship to primary tumours and prognosis after hepatic resection. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:1004-1009
- 12 Yamane N, Tsujitani S, Makino M, Maeta M, Kaibara N. Soluble CD44 variant 6 as a prognostic indicator in patients with colorectal cancer. *Oncology* 1999;56:232-238
- 13 Nanashima A, Yamaguchi H, Sawai T, Yamaguchi E, Kidogawa H, Matsuo S, Yasutake T, Tsuji T, Jibiki M, Nakagoe T, Ayabe H. Prognostic factors in hepatic metastases of colorectal carcinoma: immunohistochemical analysis of tumor biological factors. *Dig Dis Sci* 2001;46:1623-1628
- 14 蔡崎, 陆红芬, 孙孟红, 杜祥, 范月珍, 施达仁. 结直肠癌组织中CD44v3, V6蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:1255-1285
- 15 李升平, 王吉浦, 张昌卿, 谭卫民, 刘锦怀, 潘邦敏. CD44v6表达与大肠癌预后的相关性研究. *中华实验外科杂志* 1998;15:294-299
- 16 Risques RA, Moreno V, Marcuello E, Petriz J, Cancelas JA, Sancho FJ, Torregrosa A, Capella G, Peinado MA. Redefining the significance of aneuploidy in the prognostic assessment of colorectal cancer. *Lab Invest* 2001;81:307-315
- 17 Berczi C, Boci J, Bartha I, Math J, Balazs G. Prognostic value of DNA ploidy status in patients with rectal cancer. *Anticancer Res* 2002;22:3737-3741
- 18 Zou L, Mao Y, Lei S, Wei Y, Zhao X, Kan B, Jiang Y, Peng F, Wang Q, Tian L, Yang L, Liu J. The relationship of cellular DNA content with clinical stage and biological features of colorectal cancer. *Huaxi Yike Daxue Xuebao* 2000;31:180-182
- 19 Salud A, Porcel JM, Raikundalia B, Campjohn RS, Taub NA. Prognostic significance of DNA ploidy, S-phase fraction, and P-glycoprotein expression in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1999;72:167-174
- 20 Garcia-Hirschfeld Garcia J, Blanes Berenguel A, Vicioso Recio L, Marquez Moreno A, Rubio Garrido J, Matilla Vicente A. Colon cancer: p53 expression and DNA ploidy. Their relation to proximal or distal tumor site. *Rev Esp Enferm Dig* 1999;91:481-488

# 胃泌素拮抗剂增加CD自杀基因对结直肠癌细胞的杀伤作用

王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王 青

王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院普通外科 陕西省西安市 710038  
王小军, 男, 1973-02-06 生, 陕西省富平县人, 汉族, 1997 年西安医科大学毕业, 现第四军医大学普外科硕士研究生. 研究方向: 胃肠肿瘤.  
项目负责人: 王小军, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院普外科. wangxiaojun3608@sina.com  
电话: 029-3377731  
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-02-19

## Gastrin receptor antagonist combined with cytosine deaminase suicide gene therapy enhances killing of colorectal carcinoma

Xiao-Jun Wang, Qing-Jiu Ma, Da-Nian Lai, Cheng-Jin Li, Jin-Mao Li, Yong-Zhong Wu, Qing Wang

Xiao-Jun Wang, Qing-Jiu Ma, Da-Nian Lai, Cheng-Jin Li, Jin-Mao Li, Yong-Zhong Wu, Qing Wang, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China  
Correspondence to: Xiao-Jun Wang, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. wangxiaojun3608@sina.com  
Received: 2003-01-15 Accepted: 2003-02-19

## Abstract

**AIM:** To investigate the killing effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine on colorectal carcinoma when combined with gastrin receptor antagonist.

**METHODS:** Plasmid G1CEACDNa was transferred into the LoVo cell line using liposomes method. The growth curve of cells was observed when cultured with 5-FC (1 mmol/L) or/and CI-988 ( $1 \times 10^{-8}$  mmol/L) in RPMI-1640+100 ml/L fetal bovine serum. The killing efficiency was measured by MTT method. The submicroscopic structure of cells was observed by electron microscope, apoptosis was verified by a flow cytometer. CD<sup>+</sup> LoVo cells were inoculated s.c. in athymic nude mice followed by 5-fluorocytosine or/and CI-988 treatment for 20 d. these nude mice were killed with their tumor weight determined. Then tumor tissue was stained with hematoxylin and eosin, the submicroscopic structure of cells was observed by electron microscope.

**RESULTS:** After treated with 5-FC or CI-988, the inhibition rate of CD<sup>+</sup> LoVo cells was 90 % and 50 %, respectively. When these two reagents were used in combination, the inhibition rate was 40 % and 97 % on 3 d and 6 d, respectively. By MTT method, combination of CD/5-FC and CI-988 possessed superior killing effect in comparison to single therapy ( $0.53 \pm 0.05$  vs  $0.49 \pm 0.02$ ,  $0.38 \pm 0.06$ ,  $F = 29.5536$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ). Electron microscope and flow cytometer verified that cells were apoptosed after exposed to 5-FC (1 mmol/L) and CI-988 ( $1 \times 10^{-8}$  mmol/L) 72 h. Significant anti-tumor effect was observed in nude mice bearing CD<sup>+</sup> LoVo cells followed

with 5-FC (500 mg/kg body weight i.p. injection per day) or CI-988 (10 mg/kg per day orally), the inhibition rate were 69.4 % and 49.5 %, respectively. When these two reagents were used in combination, the inhibition rate was 81.5 % that was higher compared to single therapy ( $0.42 \pm 0.12$  vs  $0.69 \pm 0.11$ ,  $1.22 \pm 0.22$ ,  $F = 33.1709$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). There were apoptosis bodies in submicroscopic structure.

**CONCLUSION:** Gastrin receptor antagonist can elevate the killing effect of CD/5-FC on colorectal carcinoma. Apoptosis is possibly one of the reasons of the synergistic action.

Wang XJ, Ma QJ, Lai DN, Li CJ, Li JM, Wu YZ, Wang Q. Gastrin receptor antagonist combined with cytosine deaminase suicide gene therapy enhances killing of colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1385-1388

## 摘要

**目的:** 研究联合应用胃泌素拮抗剂和胞嘧啶脱氨酶(CD)的基因治疗对结肠癌细胞的杀伤作用。

**方法:** 脂质体法转染 G1CEACDNa 至 LoVo 细胞. 用含 1 mmol/L 5-FC 或 / 和  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988 的 100 ml/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养细胞, 测生长曲线; MTT 法测细胞杀伤率; 透射电镜观察细胞的超微结构; 流式细胞仪 annexin V 和 PI 双重染色行凋亡相关检查; Balb/c 裸鼠背部皮下接种 CD<sup>+</sup> LoVo 细胞, 5-FC (500 mg/kg) 腹腔注射或 / 和 CI-988 (10 mg/kg) 灌胃处理 20 d, 处死裸鼠后肿瘤称重, 病理切片 HE 染色, 瘤组织透射电镜检查。

**结果:** 用 5-FC 或 / 和 CI-988 处理 6 d 后 CD<sup>+</sup> LoVo 细胞抑制率分别为 90 % 和 50 %, 二者合用于 3 d 和 6 d 抑制率分别为 40 % 和 97 %; MTT 法检测联合应用 5-FC 和 CI-988 较单用任何一种处理对 CD<sup>+</sup> LoVo 细胞杀伤作用更强, 有统计学差异 ( $0.53 \pm 0.05$  vs  $0.49 \pm 0.02$ ,  $0.38 \pm 0.06$ ,  $F = 29.5536$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ); 电镜和流式细胞仪分别显示 CD/5-FC 和 CI-988 结合处理 72 h 后细胞有凋亡现象; 用 5-FC (500 mg/kg) 腹腔注射和 CI-988 (10 mg/kg) 灌胃处理荷瘤裸鼠均可出现明显的抑瘤作用, 抑瘤率分别为 69.4 % 和 49.5 %, 二者合用抑瘤较单用任一种处理更明显, 有统计学意义 ( $0.42 \pm 0.12$  vs  $0.69 \pm 0.11$ ,  $1.22 \pm 0.22$ ,  $F = 33.1709$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ), 抑瘤率达 81.5 %, 电镜下见瘤组织内有凋亡小体。

**结论:** 联合应用胃泌素拮抗剂 CI-988 可以提高 CD/5-FC 对

结肠癌细胞的杀伤作用. 凋亡相关过程可能是这种协同作用的原因.

王小军, 马庆久, 赖大年, 黎成金, 李金茂, 武永忠, 王青. 胃泌素拮抗剂增加CD自杀基因对结肠癌细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2003;11(9): 1385-1388

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1385.asp>

## 0 引言

细胞内转染胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因, 随后给予5-氟胞嘧啶(5-FC), 是近年来发展起来的肿瘤的自杀基因疗法中研究较为广泛的一种方案. 大量基础和临床实验<sup>[1-5]</sup>已经证明CD/5-FC对结肠直肠癌治疗有效. 但是, 基因治疗普遍存在转染效率低的问题限制了其应用前景. 胃泌素有刺激肠道上皮增生的能力<sup>[6-9]</sup>, 胃泌素及其受体在结肠肿瘤细胞生长调节中起着重要作用, 胃泌素拮抗剂对结肠癌的生长及转移有明显抑制作用. 我们联合应用CD/5-FC和胃泌素拮抗剂对结肠癌细胞生长的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 CEA启动子调控CD基因表达的逆转录病毒载体G1CEACDNa由第二军医大学长海医院崔龙教授惠赠; 大肠癌LoVo细胞株由上海医科大学瑞金消化外科研究所提供; Balb/c裸鼠由第四军医大学实验动物中心提供; 脂质体 lipofectamine™ 2000 (LF 2000)为Invitrogen公司产品; G 418为Gibco公司产品; 5-氟胞嘧啶(5-FC), 胃泌素拮抗剂CI-988, MTT为Sigma公司产品; RPMI1640培养基, 胎牛血清为Promega公司产品.

1.2 方法 大肠癌细胞的转染在6孔培养板中分别接种 $10^6$ 个LoVo细胞, 待细胞生长至80%融合时, 用无血清RPMI1640培养基轻洗细胞并置换原来的培养液, 再加入含4  $\mu$ g质粒DNA250  $\mu$ L和LF2000的无血清RPMI1640培养基10  $\mu$ L培养24 h, 以含400 mg/L<sup>-1</sup> G 418及100 mL/L<sup>-1</sup>胎牛血清的RPMI1640培养基传代培养转染细胞, 选择培养14 d, 筛选抗性克隆并扩增. 将CD<sup>+</sup>LoVo分别接种至4块24孔板中( $10^5$ /L), 依次分为4组. 实验组1用含1 mmol/L 5-FC的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基培养; 实验组2用含 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基培养; 实验组3用含1 mmol/L 5-FC和 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基培养; 对照组用100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基正常培养. 每天胰酶消化法计数每组4孔, 绘制细胞在不同条件下的生长曲线, 计算生长抑制率=(1-实验组细胞计数平均值/对照组同期细胞计数平均值)  $\times 100\%$ . 将CD<sup>+</sup>LoVo接种至24孔板中( $10^5$ /L), 细胞分为4组(分组情况同前), 每组设5个复孔. 于培养72 h行MTT法检测490 nm处吸光度A值, 各组A值进行方差分析. 计算细胞存活率= $A_{\text{实验组均数}}/A_{\text{对照组均数}} \times 100\%$ .

CD<sup>+</sup>LoVo培养至对数生长期, 加入含1 mmol/L 5-FC和 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基, 治疗72 h后, 收集细胞 $1 \times 10^7$ , 2.5%胰蛋白酶消化, 用无血清RPMI1640培养基洗涤2次, 2 000 r/min<sup>-1</sup>离心10 min, 贴壁加入固定液, 送电镜室包埋、切片, 透射电镜下检查. 用60 mL培养瓶2个将CD<sup>+</sup>LoVo细胞培养至对数生长期, 实验组加入含1 mmol/L 5-FC和 $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988的100 mL/L胎牛血清的RPMI1640培养基, 培养72 h后用橡皮刮收集细胞, 离心(300 g, 5 min)去上清后, 重新悬浮于1 mL的annexin V-FITC染色液, 室温下染色5 min. 在细胞悬液中加入PI保存液10  $\mu$ L, 室温下染色5 min后上机检测.

取8-12周龄Balb/c裸鼠20只, 背部皮下接种CD<sup>+</sup>LoVo细胞( $5 \times 10^6$  cell in 0.2 mL PBS), 成瘤后按体重大小编号, 随机化分为4组. 实验组1给予5-FC (500 mg/kg)腹腔注射, 实验组2给予CI-988 (10 mg/kg)灌胃, 实验组3给予5-FC (500 mg/kg)腹腔注射并CI-988 (10 mg/kg)灌胃, 对照组未给任何处理. 给药均为1次/d, 连续20 d, 处死裸鼠分离出肿瘤组织分别称重, 然后用40 g/L甲醛固定, 二期行组织切片HE染色. 其中实验组3处死裸鼠后立即取微量肿瘤组织戊二醛固定, 二期行透射电镜检测. 计算抑瘤率=(1-实验组瘤重平均值/对照组瘤重平均值)  $\times 100\%$ .

统计学处理 应用SPSS统计软件行方差分析统计学处理.

## 2 结果

2.1 LoVo细胞生长 实验组1于处理后3 d细胞开始出现死亡, 6 d时生长抑制率达90%以上; 实验组2于处理后3 d细胞出现形态变化活性降低, 4 d可见部分细胞开始死亡, 6 d时细胞生长抑制率达50%; 实验组3于处理后2 d即表现为细胞变形、空泡、折光性差, 3 d可见明显死亡现象, 抑制率达40%, 6 d抑制率达97% (图1). 实验组1, 实验组3细胞杀伤作用明显, 细胞杀伤率分别为28.7%和47.1%, A值较对照组行方差分析有显著性差异( $P < 0.01$ ); 实验组2(7.8%)未见明显杀伤细胞效应; 与对照组A值( $0.53 \pm 0.05$ )无显著性差异( $P > 0.05$ ); 实验组3( $0.28 \pm 0.04$ )较实验组1( $0.38 \pm 0.06$ )、实验组2( $0.49 \pm 0.02$ )杀伤作用更明显, 方差分析A值有显著性差异( $P < 0.01$ ).

2.2 细胞透射电镜检测 电镜下见细胞普遍脂滴较多, 可见细胞膜微绒毛消失, 边缘变平直, 细胞核皱缩, 染色质聚集在核膜下等典型凋亡征象(图2A); 同时可见细胞器溶解、核碎裂等坏死征象(图2B).

2.3 流式细胞仪 FCM图像可见实验组细胞群坏死比例为30.7%, 凋亡细胞占21.1%. 而对照组仅有坏死细胞0.1%, 凋亡细胞1.9%. 结果说明凋亡相关过程在细胞死亡机制中起重要作用.

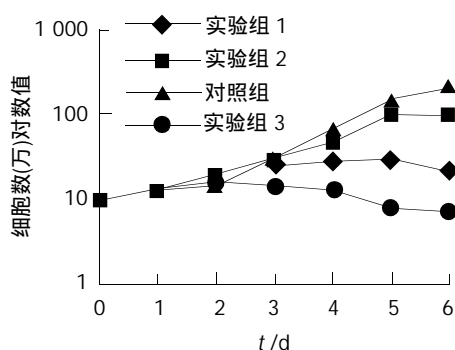


图1 细胞生长曲线。

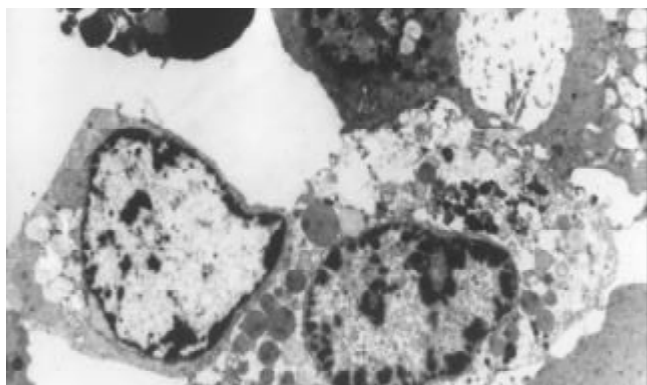


图2 培养细胞透射电镜照片 × 3 000。

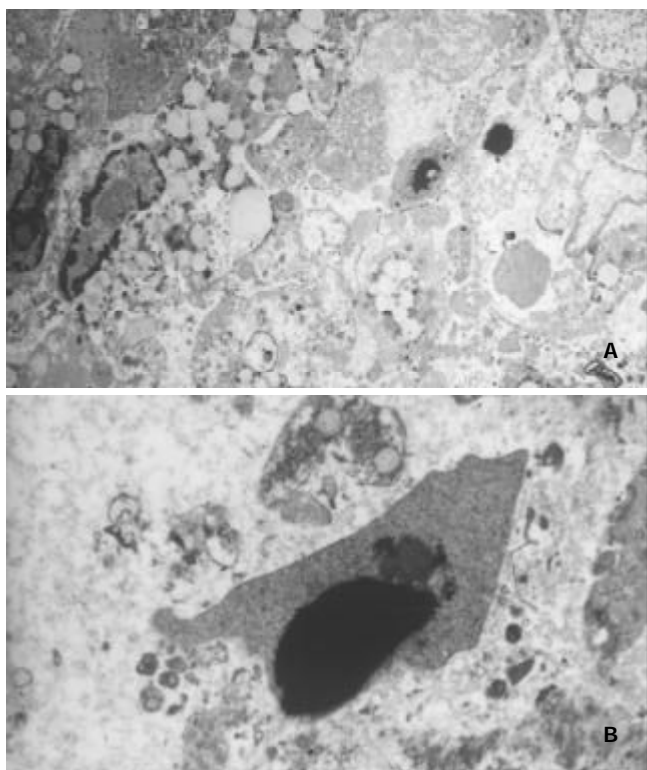


图3 实验组3肿瘤组织电镜照片 × 6 000。

2.4 裸鼠抑瘤实验肿瘤组织 接种后 10 d, 所有裸鼠均成瘤, 依分组情况分别给予处理。处死裸鼠行瘤组织称重。SPSS 软件行方差分析结果显示 3 个实验组肿瘤较对照组均明显重量减轻( $0.69 \pm 0.11$ ,  $1.22 \pm 0.22$ ,  $0.42 \pm 0.12$  vs  $2.26 \pm 0.23$ ,  $P < 0.01$ ), 说明 3 个实验组均产

生明显的抑瘤效果; 实验组 3 较实验组 1 ( $P < 0.05$ )、实验组 2 ( $P < 0.01$ )减轻更明显; 抑瘤率明显增加(81.5 % vs 69.4 %, 45.9 %); 实验组 2 较实验组 1 有显著差异( $P < 0.01$ ), 说明实验组 2 的抑瘤作用较实验组 1 弱。

2.5 移植瘤组织病理学检查 光学显微镜下 HE 染色: 实验组肿瘤组织均有明显的坏死征象和周围炎症细胞浸润。肿瘤组织超微结构: 实验组 3 肿瘤组织电镜下可见细胞大片坏死, 结构不清, 可见明显的核碎裂、核溶解及细胞器碎裂(图 3A); 同时可见部分细胞呈染色体边集成块, 核模清楚完整, 细胞边界清楚等凋亡征象及凋亡小体(图 3B)。

### 3 讨论

CD/5-FC 系统是近年来研究较多的一种基因导向的酶/前体药物治疗(GDEPT)策略, 其应用于结直肠癌的研究目前已经进入 I 期临床阶段<sup>[10, 11]</sup>。5-FU 作为结直肠癌的一线化疗药其全身给药毒副作用较大。CD/5-FC 系统应用有效的载体使肿瘤组织特异性表达 CD 基因, 其编码的酶能将对哺乳动物本身相对无毒的 5-FC 转化为细胞毒性的 5-FU, 从而表现出杀细胞效应。同时 CD/5-FC 系统还具有强大的旁观者效应。另一方面, 胃泌素前体和甘氨酸胃泌素明显刺激结直肠癌细胞生长。在过表达胃泌素前体和甘氨酸胃泌素的转基因鼠和结直肠癌细胞系均能观察到这种作用。胃泌素通过多种机制促进结直肠癌细胞生长<sup>[12-14]</sup>。多种胃泌素拮抗剂对结肠癌生长有轻度抑制作用已经得到证实<sup>[15]</sup>。CI-988 抑制肠癌 LoVo 细胞生长已在体外培养和动物实验中得到证实。本结果显示, 体外培养 6 d 时 1 mmol/L 5-FC 和  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988 分别可致转染了 CD 基因的 LoVo 细胞生长抑制率达 90 % 和 50 %, 与文献报导一致, 二者联合使用杀伤作用更明显, 于培养 3 d 和 6 d 时抑瘤率达 40 % 和 97 %。MTT 法检测杀伤率, 联合应用 1 mmol/L 5-FC 和  $1 \times 10^{-8}$  mmol/L CI-988 较单用任何一种杀细胞作用更明显, 有统计学差异( $P < 0.05$ )。动物模型抑瘤实验结果证明, 单独使用 5-FC(500 mg/kg)腹腔注射或 CI-988 (10 mg/kg)灌胃均可产生明显抑瘤效果, 有统计学差异( $P < 0.01$ ), 抑瘤率分别为 69.4 % 和 45.9 %, 与文献报导一致, 联合应用二者抑瘤效果较单用任何一种措施更明显, 有统计学差异( $P < 0.05$ )。透射电镜下体外培养及动物模型中均可见兼有凋亡与坏死征象, 这种现象同时也在体外细胞培养的流式细胞仪检测中得到证实。笔者前期实验已经证实 CD/5-FC 系统引起结肠癌 LoVo 细胞死亡的过程中有凋亡机制参与, 认为, 胃泌素拮抗剂可能通过提高结肠癌细胞对凋亡刺激的敏感性而与 CD/5-FC 产生协同治疗作用。本结果再次验证了 CD/5-FC 系统和胃泌素拮抗剂 CI-988 对结肠癌在体外细胞培养和动物模型中的杀伤作用, 同时证明联合应用胃泌素拮抗剂 CI-988 可以提高 CD/5-FC 对结肠癌细胞的杀伤作用。

## 4 参考文献

- 1 Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8:270-275
- 2 Nyati MK, Symon Z, Kievit E, Dornfeld KJ, Rynkiewicz SD, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model. *Gene Ther* 2002; 9:844-849
- 3 Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Staccini P, Saint-Paul MC, Rossi B. Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. *Hepatology* 2002;35:1144-1152
- 4 Pierrefite-Carle V, Baque P, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Saint Paul MC, Staccini P, Rossi B. Subcutaneous or intrahepatic injection of suicide gene modified tumour cells induces a systemic antitumour response in a metastatic model of colon carcinoma in rats. *Gut* 2002;50:387-391
- 5 Humphreys MJ, Ghaneh P, Greenhalf W, Campbell F, Clayton TM, Everett P, Huber BE, Richards CA, Ford MJ, Neoptolemos JP. Hepatic intra-arterial delivery of a retroviral vector expressing the cytosine deaminase gene, controlled by the CEA promoter and intraperitoneal treatment with 5-fluorocytosine suppresses growth of colorectal liver metastases. *Gene Ther* 2001;8:1241-1247
- 6 Siddheshwar RK, Gray JC, Kelly SB. Plasma levels of progastrin but not amidated gastrin or glycine extended gastrin are elevated in patients with colorectal carcinoma. *Gut* 2001;48: 47-52
- 7 Singh P, Velasco M, Given R, Varro A, Wang TC. Progastrin expression predisposes mice to colon carcinomas and adenomas in response to a chemical carcinogen. *Gastroenterology* 2000;119:162-171
- 8 Kermorgant S, Lehy T. Glycine-extended gastrin promotes the invasiveness of human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:136-141
- 9 Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Short term infusion of glycine-extended gastrin (17) stimulates both proliferation and formation of aberrant crypt foci in rat colonic mucosa. *Int J Cancer* 2001;94:307-313
- 10 Cunningham C, Nemunaitis J. A phase I trial of genetically modified *Salmonella typhimurium* expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. *Hum Gene Ther* 2001;12: 1594-1596
- 11 Harvey BG, Maroni J, O' Donoghue KA, Chu KW, Muscat JC, Pippo AL, Wright CE, Hollmann C, Wisnivesky JP, Kessler PD, Rasmussen HS, Rosengart TK, Crystal RG. Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions. *Hum Gene Ther* 2002;13:15-63
- 12 Koh TJ, Bulitta CJ, Fleming JV, Dockray GJ, Varro A, Wang TC. Gastrin is a target of the beta-catenin /TCF-4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J Clin Invest* 2000;106:533-539
- 13 Hollande F, Choquet A, Blanc EM, Lee DJ, Bali JP, Baldwin GS. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinases in glycine-extended gastrin-induced dissociation and migration of gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:40402-40410
- 14 Wu H, Rao GN, Dai B, Singh P. Autocrine gastrins in colon cancer cells Up-regulate cytochrome C oxidase Vb and down-regulate efflux of cytochrome c and activation of caspase-3. *J Biol Chem* 2000;275:32491-32498
- 15 Melen-Mucha G. Effects of short term treatment with pentagastrin, proglumide, tamoxifen given separately or together with 5-fluorouracil on the growth in the murine transplantable Colon 38 cancer. *Neoplasma* 2001;48:133-138



# aFGF 和 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 PKC 及 ERK 活性的影响

尚海, 张颐, 单吉贤

尚海, 辽宁省肿瘤医院肝胆胰外科 辽宁省沈阳市 110042  
张颐, 中国医科大学附属第一医院妇科 辽宁省沈阳市 110001  
单吉贤, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110001  
尚海, 男, 1968-01-26 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 肿瘤学博士, 讲师. 主要从事消化道肿瘤的研究.  
项目负责人: 尚海, 110042, 辽宁省沈阳市, 辽宁省肿瘤医院肝胆胰外科. syzi@163.com  
电话: 024-22711682  
收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-03-25

## Effects of aFGF and genistein on PKC and ERK activity in human colorectal cancer cell line CCL229

Hai Shang, Yi Zhang, Ji-Xian Shan

Hai Shang, Department of Hepatobiliary Surgery, Liaoning Provincial Tumor Hospital, Shenyang 110042, Liaoning Province, China  
Yi Zhang, Department of Gynecology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Ji-Xian Shan, Department of Oncology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Hai Shang, Liaoning Provincial Tumor Hospital, Shenyang 110042, Liaoning Province, China. syzi@163.com.cn  
Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-03-25

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of aFGF and TPK inhibitor genistein on intracellular PKC and ERK activity in CCL229 cell line.

**METHODS:** The activities of PKC and ERK in cells induced by different concentrations of aFGF (0.15 mg/L, 0.30 mg/L, 0.60 mg/L, 1.20 mg/L) and genistein (6.00 mg/L, 12.00 mg/L, 24.00 mg/L, 48.00 mg/L) were detected by incorporation of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP into exogenous substrates.

**RESULTS:** The intracellular PKC and ERK activity increased with aFGF in a dose dependent manner ( $P < 0.05$ ). When the concentration of aFGF was 1.20 mg/L, the activity of PKC in cytosol and PKC in membrane and ERK was 2.60, 2.79, 1.77 times higher than control group. Genistein suppressed the intracellular PKC and ERK activity also in a dose dependent manner ( $P < 0.05$ ). When the concentration of genistein was 48.00 mg/L, the activity of PKC in cytosol and PKC in membrane and ERK was 0.41, 0.36, 0.50 times higher than that in control group. The activity of PKC and ERK decreased apparently when the cells were treated with aFGF.

**CONCLUSION:** aFGF receptor in human colorectal cancer cell line CCL229 possesses TPK activity. Tyrosine-specific protein phosphorylation may initiate a cascade of biochemical

events, which may increase the intracellular PKC and ERK activity.

Shang H, Zhang Y, Shan JX. Effects of aFGF and genistein on PKC and ERK activity in human colorectal cancer cell line CCL229. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1389-1391

## 摘要

**目的:** 观察 aFGF 及 TPK 抑制剂 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 细胞内 PKC 及 ERK 活性的影响, 探讨其信号传导途径.

**方法:** 以不同浓度的 aFGF (0.15 mg/L, 0.30 mg/L, 0.60 mg/L, 1.20 mg/L) 和 genistein (6.00 mg/L, 12.00 mg/L, 24.00 mg/L, 48.00 mg/L) 诱导 CCL229 细胞, 利用 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 掺入外源性底物的方法, 液体闪烁测定 PKC 及 ERK 活性.

**结果:** 随着 aFGF 浓度的增加, PKC 及 ERK 活性随之升高, 与 aFGF 浓度呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ). 当 aFGF 浓度为 1.20 mg/L 时, PKC (胞质), PKC (胞膜) 和 ERK 活性分别为对照组的 2.60, 2.79, 1.77 倍. genistein 抑制细胞内 PKC 及 ERK 活性, 且与 genistein 浓度呈剂量依赖效应 ( $P < 0.05$ ). 当 genistein 浓度为 48.00 mg/L 时, PKC (胞质), PKC (胞膜) 和 ERK 活性分别为对照组的 0.41, 0.36, 0.50 倍. genistein 对 aFGF 诱导的 PKC 及 ERK 活性抑制更显著.

**结论:** 大肠癌细胞株 CCL229 中 aFGF 受体具有 TPK 活性, TPK 激活后促进蛋白质和酶磷酸化, 导致 PKC 和 ERK 活性升高, 进一步证明 PKC 及 ERK 确是 TPK 的下游信号分子.

尚海, 张颐, 单吉贤. aFGF 和 genistein 对大肠癌细胞株 CCL229 PKC 及 ERK 活性的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1389-1391

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1389.asp>

## 0 引言

酸性成纤维细胞生长因子 (acidic fibroblast growth factor, aFGF) 是一种多肽生长因子, 能刺激血管生长, 与肿瘤的生长密切相关. 目前 aFGF 在实体瘤细胞内的信号传导途径尚不清楚. 我们观察 aFGF 对大肠癌细胞株 CCL229 细胞蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated kinase, ERK) 活性的影响, 以及用酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, TPK) 抑制剂 genistein 处理后 PKC 及 ERK 的变化趋势, 进一步认识肿瘤细胞的信号传导机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人大肠癌细胞系 CCL229, 由中国医科大学细胞生物教研室提供; aFGF 购自北京邦定科技有限公司; Genistein, DMEM 培养基、鱼精蛋白(protamine)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)均购自 Sigma 公司; [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 购自北京亚辉生物制品公司; 液闪仪(美国 Beckman 1801 型), 紫外分光光度计(UV310 型).

1.2 方法 CCL229 细胞在含 100 mL/L 小牛血清、100 kU/L 青霉素, 100 g/L 链霉素的 DMEM 培养基中贴壁生长, 于 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 950 mL/L 空气培养箱中传代培养. 将培养的 CCL229 细胞随机分为: 空白对照组; aFGF 组(0.15 mg/L, 0.3 mg/L, 0.6 mg/L, 1.2 mg/L); Gen 组(6 mg/L, 12 mg/L, 24 mg/L, 48 mg/L); aFGF+ genistein 组. 当细胞达到亚融合状态时, 吸出旧培养液, 每瓶加入无血清培养液 2 mL, 12 h 后吸出旧培养液, 按分组要求分别加入肝素 15  $\mu$ L (40  $\mu$ g/L), 不同量的 aFGF, Genistein 及培养液, 使各瓶终体积均为 2 mL. aFGF+ genistein 组, 细胞与 Genistein 温浴 30 min 后加入 aFGF, 3 h 后测定 PKC 及 ERK 活性.

1.2.1 PKC 活性的测定 按改良 Takai 法. 将处理的细胞于粉碎缓冲液(1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaF, 1 mmol/L PMSF, 0.01  $\mu$ g/L 亮肽素, 0.01  $\mu$ g/L 抑肽酶, 0.01  $\mu$ g/L 胃酶抑素, 50 mmol/L  $\beta$ -磷酸甘油, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.9 g/L Brig35)超声粉碎, 离心(100 000 g, 1 h, 4 °C), 上清为胞质蛋白提取液. 沉淀部分加入溶膜液(2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA, 20 mmol/L Tris-Cl pH7.5, 0.25 mol/L 蔗糖), 悬起后超声粉碎, 4 °C 过夜, 离心(100 000 g, 1 h, 4 °C), 上清为膜蛋白提取液. PKC 活性测定, 以 PKC 使 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 掺入外源性底物鱼精蛋白的磷酸放射活性为 PKC 活性标志. 取胞质及胞膜提取液, 每个样品取 3 个平行管, 每管 20  $\mu$ L, 同加有 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 的底物混合液 30  $\mu$ L (25 mmol/L 醋酸镁 10  $\mu$ L,  $2.5 \times 10^{-4}$  mol/L ATP 10  $\mu$ L, 10 g/L protamine 2  $\mu$ L, 1 mol/L Tris-HCl pH7.5 1  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L), 30 °C 反应 8 min, 反应完成后取 25  $\mu$ L 点在 Whatman 强阳离子交换滤纸上, 在 75 mmol/L 磷酸溶液中洗 3 次, 每次 3 h, 装入液闪瓶, 液体闪烁测定 cpm 数.

1.2.2 ERK 活性测定 取胞质提取液 20  $\mu$ L (3 个平行管), 同 10  $\mu$ L 加有 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP 底物混合液(5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,  $2.5 \times 10^{-4}$  mol/L ATP, MBP, 20 mmol/L Tris-HCl pH7.5, H<sub>2</sub>O)混合, 30 °C 反应 30 min, 其余同测 PKC 活性.

统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  标准差表示. 数据分析采用统计程序软件包(SPSS8.0 for Windows)进行方差分析和多重比较. 应用 Student' t 检验来判断差异的统计学意义, P < 0.05 具有显著性.

## 2 结果

2.1 aFGF 诱导大肠癌细胞株 CCL229 后, PKC 及 ERK

活性均增高, 且与 aFGF 呈剂量依赖效应. 与对照组比较, 有显著差异(P < 0.05). 对比之下, 胞膜 PKC 活性比胞质 PKC 活性升高更为明显(表 1).

表 1 aFGF 诱导后 CCL229 细胞 PKC 及 ERK 活性变化( $\bar{x} \pm s$ , nkat/L)

aFGF(mg/L)	PKC(胞质)	PKC(胞膜)	ERK
0.00	6.30 $\pm$ 1.56	6.61 $\pm$ 1.27	0.22 $\pm$ 0.04
0.15	6.63 $\pm$ 1.69	7.30 $\pm$ 2.23	0.24 $\pm$ 0.03
0.30	9.44 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	10.46 $\pm$ 2.09 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
0.60	11.39 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	13.32 $\pm$ 1.81 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
1.20	16.38 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>	18.42 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>	0.39 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 对照组.

2.2 Genistein 诱导作用 加入抑制剂 Genistein 后, PKC 及 ERK 活性与对照组相比, 明显受抑制(P < 0.05, 表 2). 其抑制程度与 Genistein 浓度呈剂量依赖关系.

表 2 Genistein 诱导后 CCL229 细胞 PKC 及 ERK 活性变化( $\bar{x} \pm s$ , nkat/L)

Genistein (mg/L)	PKC(胞质)	PKC(胞膜)	ERK
0.00	6.30 $\pm$ 1.56	6.61 $\pm$ 1.27	0.22 $\pm$ 0.04
6.00	5.96 $\pm$ 1.84	6.05 $\pm$ 1.64	0.20 $\pm$ 0.05
12.00	5.04 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>	5.19 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
24.00	3.56 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>	3.40 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
48.00	2.61 $\pm$ 1.20 <sup>a</sup>	2.40 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 对照组.

2.3 Genistein 及 aFGF 作用 Gen 组与 aFGF+ gen 组比较可见, Genistein 对 aFGF+ Gen 组细胞的 PKC 及 ERK 抑制作用更明显(P < 0.05, 表 3).

表 3 aFGF+ Gen 组 PKC 及 ERK 活性变化( $\bar{x} \pm s$ , nkat/L)

aFGF(mg/L)	Genistein(mg/L)	PKC(胞质)	PKC(胞膜)	ERK
0.60	0.00	11.39 $\pm$ 2.12	13.32 $\pm$ 1.81	0.34 $\pm$ 0.05
0.60	6.00	10.25 $\pm$ 1.99	11.60 $\pm$ 1.51	0.30 $\pm$ 0.03
0.60	12.00	8.20 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	10.26 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
0.60	24.00	5.47 $\pm$ 1.56 <sup>a</sup>	5.33 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
0.60	48.00	4.10 $\pm$ 1.78 <sup>a</sup>	3.46 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05 vs 对照组.

## 3 讨论

aFGF 是一种强有力的细胞分裂促进因子, 对成纤维细胞在内的多种细胞具有促进增生和分化的功能, 与肿瘤生长密切相关<sup>[1-13]</sup>. 我们观察 aFGF 诱导大肠癌细胞株 CCL229 细胞 PKC 及 ERK 活性变化, 并用 TPK 抑制剂 genistein 作用细胞, 进一步认识 aFGF 诱导肿瘤细胞分裂增生的细胞内信号传导机制. PKC 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 广泛分布于真核细胞, 在跨膜信息传递、细胞

增生分化及肿瘤侵袭转移等方面均发挥重要作用<sup>[14-24]</sup>. ERK 则是有丝分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的成员之一, 可被生长因子、激素、神经递质等激活, 在细胞生长、发育、分裂、死亡及恶性转化等过程中起重要作用<sup>[25-27]</sup>. 我们发现不同浓度的 aFGF 作用于细胞后, 可导致该细胞内 PKC 及 ERK 活性明显升高, 且其升高程度与 aFGF 浓度均呈显著正相关. 说明 aFGF 在一定浓度范围内, 可激活该细胞株 PKC 及 ERK. 随 aFGF 浓度升高, PKC 及 ERK 的活性变化趋势基本一致. 说明 PKC 及 ERK 两个途径不是孤立的, aFGF 对该细胞株的影响在这两个系统中持续循环放大. 胞质 PKC 及胞膜 PKC 活性均显著升高, 尤其胞膜 PKC 活性升高更明显, 提示 PKC 激活时可能发生膜转移现象.

VEGF 诱导内皮细胞的促有丝分裂作用通过激活 PKC 途径, 酪氨酸蛋白激酶抑制剂可阻断此反应, 从而说明 PKC 是 TPK 的下游信号分子. 本实验用 TPK 的特异性抑制剂 Genistein 作用细胞, 发现细胞内 PKC 及 ERK 活性均明显受抑制, 且抑制程度与 Genistein 浓度呈剂量依赖效应. Genistein 对 aFGF+Gen 组 PKC 及 ERK 的活性的抑制作用明显强于 Gen 组. 提示 aFGF 对 CCL229 细胞 PKC 及 ERK 的激活是通过 TPK 来介导的, TPK 抑制剂 Genistein 可阻断 aFGF 诱导的 PKC 及 ERK 活化; aFGF+Gen 组细胞 PKC 及 ERK 活性受抑制更明显, 提示 CCL229 细胞中 aFGF 主要通过 TPK 途径来激活 PKC 与 ERK, 从而促进细胞增生.

#### 4 参考文献

- Jemth P, Kreuger J, Kusche-Gullberg M, Sturiale L, Gimenez-Gallego G, Lindahl U. Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs. Exploring the structural diversity by screening for fibroblast growth factor (FGF)1 and FGF2 binding. *J Biol Chem* 2002; 277:30567-30573
- Rogala E, Skopinska-Rozewska E, Sommer E, Pastewka K, Chorostowska-Wynimko J, Sokolnicka I, Kazon M. Assessment of the VEGF, bFGF, aFGF and IL8 angiogenic activity in urinary bladder carcinoma, using the mice cutaneous angiogenesis test. *Anticancer Res* 2001;21:4259-4263
- El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR. FGF-1 and FGF-2 regulate the expression of E-cadherin and catenins in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001;94:652-661
- Chiu IM, Touhalisky K, Baran C. Multiple controlling mechanisms of FGF1 gene expression through multiple tissue-specific promoters. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;70:155-174
- So F, Daley TD, Jackson L, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2, and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors. *J Oral Pathol Med* 2001;30:428-433
- Sebti SM, Hamilton AD. Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties. *Oncogene* 2000; 19:6566-6573
- El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR. FGF-1 and FGF-2 modulate the E-cadherin/catenin system in pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 2001;84:1656-1663
- La Rosa S, Sessa F, Colombo L, Tibiletti MG, Furlan D, Capella C. Expression of acidic fibroblast growth factor (aFGF) and fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in breast fibroadenomas. *J Clin Pathol* 2001;54:37-41
- Shin EY, Lee BH, Yang JH, Shin KS, Lee GK, Yun HY, Song YJ, Park SC, Kim EG. Up-regulation and co-expression of fibroblast growth factor receptors in human gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:519-528
- Sakorafas GH, Tsiotou AG, Tsiotos GG. Molecular biology of pancreatic cancer; oncogenes, tumour suppressor genes, growth factors, and their receptors from a clinical perspective. *Cancer Treat Rev* 2000;26:29-52
- Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Neal DE, Leung HY. aFGF immunoreactivity in prostate cancer and its co-localization with bFGF and FGF8. *J Pathol* 1999;189:564-569
- Zhang L, Kharbanda S, McLeskey SW, Kern FG. Overexpression of fibroblast growth factor 1 in MCF-7 breast cancer cells facilitates tumor cell dissemination but does not support the development of macrometastases in the lungs or lymph nodes. *Cancer Res* 1999;59:5023-5029
- Madiat F, Hackshaw KV, Chiu IM. Characterization of the entire transcription unit of the mouse fibroblast growth factor 1 (FGF-1) gene. Tissue-specific expression of the FGF-1. A mRNA. *J Biol Chem* 1999;274:11937-11944
- Spitaler M, Wiesenhofer B, Biedermann V, Seppi T, Zimmermann J, Grunicke H, Hofmann J. The involvement of protein kinase C isoenzymes alpha, epsilon and zeta in the sensitivity to antitumor treatment and apoptosis induction. *Anticancer Res* 1999;19:3969-3976
- Barrett CM, Lewis FL, Roaten JB, Sweatman TW, Israel M, Cleveland JL, Lothstein L. Novel extranuclear-targeted anthracyclines override the antiapoptotic functions of Bcl-2 and target protein kinase C pathways to induce apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:469-481
- Gopalakrishna R, Gundimeda U. Antioxidant regulation of protein kinase C in cancer prevention. *J Nutr* 2002;132:3819S-3823S
- Chen Y, Wu Q, Song SY, Su WJ. Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1014-1018
- Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, Faenza I, Cappellini A, Bareggi R, Manzoli L, Cocco L. Molecular characterization of protein kinase C-alpha binding to lamin A. *J Cell Biochem* 2002; 86:320-330
- Langzam L, Koren R, Gal R, Kugel V, Paz A, Farkas A, Sampson SR. Patterns of protein kinase C isoenzyme expression in transitional cell carcinoma of bladder. Relation to degree of malignancy. *Am J Clin Pathol* 2001;116:377-385
- Sumitomo M, Shen R, Goldberg JS, Dai J, Navarro D, Nanus DM. Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuro peptide-induced protein kinase C delta degradation. *Cancer Res* 2000; 60:6590-6596
- Buchner K. The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:1-11
- Zhu GH, Wong BC, Eggo MC, Ching CK, Yuen ST, Chan EY, Lai KC, Lam SK. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in gastric cancer cells is blocked by protein kinase C activation through inhibition of c-myc. *Br J Cancer* 1999;79:393-400
- Perletti GP, Marras E, Concari P, Piccinini F, Tashjian AH Jr. PKCdelta acts as a growth and tumor suppressor in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 1999;18:1251-1256
- Cowell HE, Garrod DR. Activation of protein kinase C modulates cell-cell and cell-substratum adhesion of a human colorectal carcinoma cell line and restores 'normal' epithelial morphology. *Int J Cancer* 1999;80:455-464
- Arbabi S, Maier RV. Mitogen-activated protein kinases. *Crit Care Med* 2002;30:S74-S79
- Zhu X, Castellani RJ, Takeda A, Nunomura A, Atwood CS, Perry G, Smith MA. Differential activation of neuronal ERK, JNK/SAPK and p38 in Alzheimer disease: the 'two hit' hypothesis. *Mech Ageing Dev* 2001;123:39-46
- Kim SC, Hahn JS, Min YH, Yoo NC, Ko YW, Lee WJ. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* 1999;93:3893-3899

# 牛磺酸对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究

梁 健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海锋, 梁劲松, 黄仁彬, 韦 新, 韦 明

梁健, 袁海锋, 广西中医学院附属瑞康医院 广西壮族自治区  
南宁市 530011  
张锡流, 韦新, 梁劲松, 广西中医学院第一附属医院 广西壮族自治区  
南宁市 530023  
杨光业, 广西医学情报研究所 广西壮族自治区南宁市 530023  
庞玉生, 黄仁彬, 广西医科大学 广西壮族自治区南宁市 530021  
韦明, 广西中医学院卫生统计教研室 广西壮族自治区南宁市 530011  
梁健, 男, 1963-10-10 生, 广西平南人, 汉族. 1987 年广西医科大学本科毕业, 副主任医师, 中华医学会广西分会消化专业常委, 广西中西医结合消化专业主任委员, 主要从事消化系统疾病的临床与研究.  
广西壮族自治区自然科学基金项目, No.0144016  
项目负责人: 梁健, 530011, 广西壮族自治区南宁市, 南宁市华东路 10 号, 广西中医学院附属瑞康医院. I-j588@tom.com  
电话: 0771-2188398 传真: 0771-2411156  
收稿日期: 2003-05-18 接受日期: 2003-06-06

## Inhibitory mechanism of taurine against CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis in rats

Jian Liang, Guang-Ye Yang, Xi-Liu Zhang, Yu-Sheng Pang,  
Hai-Feng Yuan, Jing-Song Liang, Ren-Bin Huang, Xin Wei,  
Ming Wei

Jian Liang, Hai-Feng Yuan, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Xi-Liu Zhang, Xin Wei, Jing-Song Liang, First Affiliated Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical College, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Guang-Ye Yang, Guangxi Medical Information Institute, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Yu-Sheng Pang, Ren-Bin Huang, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Ming Wei, Department of Health Statistics, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region, No.0144016  
Correspondence to: Jian Liang, Affiliated Ruikang Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical College, 10 Huadong Road, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. I-j588@tom.com  
Received: 2003-05-18 Accepted: 2003-06-06

## Abstract

AIM: To study the protective effect of taurine on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in rats and its mechanisms.

METHODS: CCl<sub>4</sub>-induced rat hepatic fibrosis was treated by taurine (400 and 800 mg/kg per day for 12 weeks), and serum alanine aminotransferase (ALT), plasma protein, hyaluronic acid (HA) and procollagen III (PC III), and hepatic hydroxyproline (HYP), hepatic microsomal drug-metabolizing enzyme and anti-transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) were measured. In addition, pathological changes of liver tissue were observed by light microscope.

RESULTS: The hepatic fibrosis, activity of serum ALT ( $2\,601 \pm 300 \rightarrow 1367 \pm 317$  nkat/L,  $P < 0.01$ ), and contents of serum HA ( $324 \pm 95 \rightarrow 219 \pm 79$   $\mu$ g/L,  $P < 0.01$ ), PC III ( $33 \pm 14 \rightarrow 19 \pm 8$  mg/L,  $P < 0.01$ ) and hepatic HYP ( $1\,282 \pm 523 \rightarrow 381 \pm 147$   $\mu$ g/L,  $P < 0.01$ ) were markedly reduced by the treatment with taurine ( $32.57 \pm 13.73$  vs  $19.20 \pm 8.25$  ng/ml,  $P < 0.01$  and  $1.282 \pm 0.523$  vs  $0.463 \pm 0.159$   $\mu$ g/ml,  $P < 0.05$ ). The contents of plasma albumin ( $23 \pm 3 \rightarrow 31 \pm 4$  g/L,  $P < 0.05$ ) and hepatic cytochrome P450 (Cyt.P450) ( $211 \pm 27 \rightarrow 811 \pm 136$  nmol/g,  $P < 0.01$ ) and cytochrome b<sub>5</sub> (Cyt.b<sub>5</sub>) ( $256 \pm 69 \rightarrow 761 \pm 131$  nmol/g,  $P < 0.01$ ) were increased by the same treatment ( $0.211 \pm 0.027$  vs  $0.765 \pm 0.106$  nmol/mg protein,  $P < 0.01$  and  $0.256 \pm 0.069$  vs  $0.697 \pm 0.120$  nmol/mg protein,  $P < 0.01$ ). In addition, taurine could also significantly inhibit the expression of TGF- $\beta_1$  ( $33 \pm 13 \rightarrow 20 \pm 6$ ,  $P < 0.01$ ).

CONCLUSION: CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis is markedly relieved by the treatment of taurine, and its protective mechanisms are related to the decrease in liver injury and expression of TGF- $\beta_1$ .

Liang J, Yang GY, Zhang XL, Pang YS, Yuan HF, Liang JS, Huang RB, Wei X, Wei M. Inhibitory mechanism of taurine against CCl<sub>4</sub> induced hepatic fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(9):1392-1395

## 摘要

目的: 观察牛磺酸对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)诱导大鼠肝纤维化的保护作用及其机制。

方法: 采用 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化模型, 研究牛磺酸 (400 and 800 mg/kg per day for 12 weeks) 对血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血浆蛋白、透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PC III)及肝组织羟脯氨酸(HYP)、肝药酶和抗转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 的影响, 并观察肝组织病理学变化。

结果: 牛磺酸能明显减轻纤维化程度, 降低 ALT ( $2\,601 \pm 300 \rightarrow 1367 \pm 317$  nkat/L,  $P < 0.01$ ), HA ( $324 \pm 95 \rightarrow 219 \pm 79$   $\mu$ g/L,  $P < 0.01$ ), PC III ( $33 \pm 14 \rightarrow 19 \pm 8$   $\mu$ g/L,  $P < 0.01$ ) 和 HYP ( $1\,282 \pm 523 \rightarrow 381 \pm 147$   $\mu$ g/L,  $P < 0.01$ ) 水平, 提高肝细胞色素 P450 (Cyt.P450) ( $211 \pm 27 \rightarrow 811 \pm 136$  nmol/g,  $P < 0.01$ ), 细胞色素 b<sub>5</sub> (Cyt.b<sub>5</sub>) ( $256 \pm 69 \rightarrow 761 \pm 131$  nmol/g,  $P < 0.01$ ) 和血清白蛋白含量 ( $23 \pm 3 \rightarrow 31 \pm 4$  g/L,  $P < 0.05$ ), 并明显减少 TGF- $\beta_1$  的表达 ( $33 \pm 13 \rightarrow 20 \pm 6$ ,  $P < 0.01$ )。

结论: 牛磺酸具有显著的抗 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化作用, 其作用机制可能与减轻肝细胞损伤和抑制 TGF- $\beta_1$  的

表达有关.

梁健, 杨光业, 张锡流, 庞玉生, 袁海峰, 梁劲松, 黄仁彬, 韦新, 韦明. 牛磺酸对 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及其机制的研究. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1392-1395  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1392.asp>

## 0 引言

肝纤维化是以细胞外基质(ECM)<sup>[1-10]</sup>合成增多, 降解相对不足, 过多沉积在肝内引起,是可逆病变, 因此, 减轻纤维化反应十分重要<sup>[11-16]</sup>. 牛磺酸是体内含量最丰富的氨基酸, 参与膜主要成分磷脂代谢, 保护膜磷脂免受降解, 具有直接膜稳定作用<sup>[2]</sup>. 此外, 还具有清除自由基和抗脂质过氧化<sup>[3,4]</sup>等广泛的生物学作用. 我们建立实验性大鼠 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化模型, 探讨牛磺酸对肝纤维化的防治作用及其可能的机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠, SPF 级, ♂, 体质量 230 ± 20 g, 由广西医科大学实验动物中心提供; 牛磺酸为湖州市生物化学试剂厂产品; CCl<sub>4</sub> 为上海试剂三厂产品; HA、PC III 放射免疫分析测定盒, 均为上海海军医学研究所生物技术中心产品; HYP 试剂盒为南京建成生物工程公司研究所产品, 批号分别 20020108; TGF-β<sub>1</sub> mAb 及 SABC 免疫组化染色试剂盒, 由武汉博士德生物工程有限公司提供; 彩色病理图纹分析系统, 型号 HPIAAS-1000, (JVCKY-F30B3-CCD 摄像头, 日本 Olympus 研究型显微镜, 华海公司生产的全自动图像分析系统) 为中国华海电子有限公司产品; 紫外-可见分光光度计比色, 型号 DU-640, 为美国 Beckman 公司产品; 自动生化分析仪, 型号 TBA-120FR, 为日本东芝公司产品.

1.2 方法 将实验动物分为正常对照组, 模型组, 牛磺酸大剂量组和小剂量组, 每组 20 只. 给予大鼠皮下注射 400 mL/L CCl<sub>4</sub> 橄榄油溶液, 首剂量按质量计算为 5 mL/kg, 以后 2 次/wk, 每次剂量为 3 mL/kg, 连续注射 12 wk, 并在实验过程自由饮用 100 mL/L 乙醇作为饮水. 牛磺酸小剂量组在造模的同时给予牛磺酸 400 mg/kg, 牛磺酸大剂量组给予牛磺酸 800 mg/kg, ig, 1 次/d, 并予正常饮食. 正常对照组 ig 等容积的生理盐水. 实验动物在最后 1 次注射 CCl<sub>4</sub> 隔夜禁食 16 h 后, 取血用作生化、HA 和 PC III 含量测定, 取部分肝组织匀浆用作测定肝药酶和 HYP, 肝组织用 40 g/L 甲醛溶液常规固定、石蜡切片, 用作病理组织学检查和免疫组化实验. 用自动生化分析仪测定血清 TP, ALB 和 ALT, 用放射免疫法测定血清 HA, PC III 含量. 按 Omura and Sato 方法测定肝组织 Cyt. P450 含量(J Biol Chem 1964;239:2370-2385), 唐跃年 et al<sup>[9]</sup>方法测定 Cyt.b<sub>5</sub> 含量, 周少春 et al<sup>[10]</sup>方法测定 HYP. 用免疫组化法测定肝组织 TGF-β<sub>1</sub> 的表达. 肝组织分别用 HE 染色和 Masson 法胶原纤维染色, 在光学显微镜下观察, 按肝组织病理诊断标准做出肝组织

病理分期诊断, 分级方法参见曾民德 et al<sup>[11]</sup>方法. 胶原纤维定量测定: 采用肝组织胶原纤维染色标本, 放大 400 倍, 于标本四角和中央位置选取 5 个视野, 测定每一视野中胶原纤维含量, 以纤维占视野面积的百分比表示, 取其平均值.

统计学处理 用 SPSS10.0 软件统计, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较用 t 检验, 各组大鼠纤维增生程度的比较用秩和检验.

## 2 结果

2.1 肝组织病理学变化 模型组可见多数肝小叶结构紊乱, 肝细胞脂肪变性广泛, 部分有坏死, 门管区及肝小叶内有较多炎性细胞浸润, 纤维组织增生显著, 包绕肝小叶(图 1, 2). 牛磺酸治疗组肝组织结构有较明显改善, 肝细胞脂肪变性显著减轻, 炎性细胞浸润和纤维组织增生减少(图 3, 4)(表 1).

表 1 各组大鼠肝纤维化程度的比较

分组	n	肝纤维化分期				
		S0	S1	S2	S3	S4
正常对照组 <sup>a</sup>	20	20	0	0	0	0
模型组	20	0	3	3	10	4
牛磺酸小剂量 <sup>a</sup>	20	0	12	5	3	0
牛磺酸大剂量 <sup>a</sup>	20	0	14	4	2	0

<sup>a</sup>P < 0.05, vs 模型组.

表 2 牛磺酸对肝纤维化大鼠血清学的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 20)

分组	ALT (nkat/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)	Cyt.P450 (nmol/g)	Cyt.b <sub>5</sub> (nmol/g)
正常对照组	783±133 <sup>b</sup>	67±13 <sup>a</sup>	38±6 <sup>b</sup>	506±39 <sup>b</sup>	804±142 <sup>b</sup>
模型组	2 601±300	58±16	23±3	211±27	256±69
牛磺酸小剂量	1 633±283 <sup>b</sup>	62±15 <sup>a</sup>	28±7 <sup>b</sup>	765±106 <sup>b</sup>	697±120 <sup>b</sup>
牛磺酸大剂量	1 367±317 <sup>b</sup>	64±11 <sup>a</sup>	31±4 <sup>b</sup>	811±136 <sup>b</sup>	761±131 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 模型组.

表 3 牛磺酸对纤维化大鼠血清 HA、PC III 和肝脏 HYP、TGF-β<sub>1</sub> 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ , n = 20)

分组	HA(μg/L)	HYP(μg/L)	PC III(μg/L)	TGF-β <sub>1</sub>
正常对照组	146±51 <sup>b</sup>	221±144 <sup>b</sup>	9±4 <sup>b</sup>	15±5 <sup>b</sup>
模型组	324±95	1 282±523	33±14	33±13
牛磺酸小剂量	262±92 <sup>b</sup>	463±159 <sup>b</sup>	19±8 <sup>b</sup>	20±6 <sup>b</sup>
牛磺酸大剂量	219±79 <sup>b</sup>	381±147 <sup>b</sup>	19±8 <sup>b</sup>	20±6 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01, vs 模型组.

2.2 血清学变化 模型组肝纤维化大鼠血清中 ALT 活性升高, 总蛋白和白蛋白水平降低, HA 和 PC III 水平显著升高. 肝组织的 Cyt.P450 和 Cyt.b<sub>5</sub> 含量降低, HYP 含



量提高. 而牛磺酸治疗组 ALT, HA, PC III 和 HYP 水平比模型组明显降低( $P < 0.01$ ), Cyt.P450 和白蛋白水平较模型组明显升高( $P < 0.01$ ). 此外, 牛磺酸治疗组的 TGF- $\beta_1$  的表达也较模型组显著减少( $P < 0.01$ ). (表 2, 3).

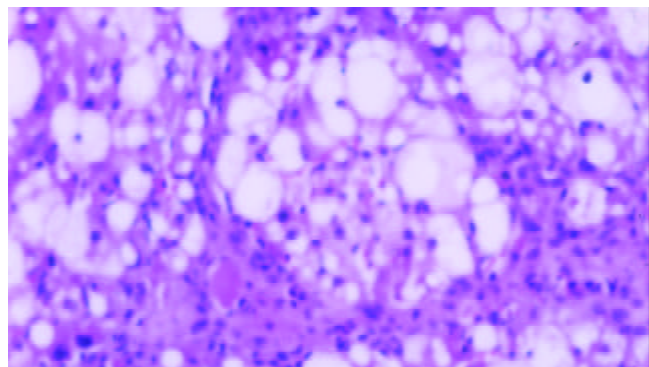


图1 模型组 HE 染色切片( $\times 100$ ).

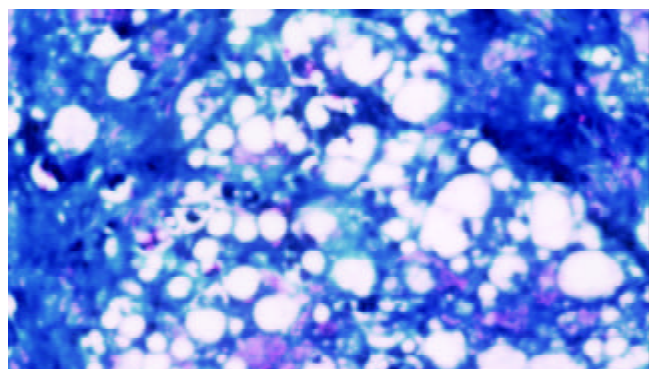


图2 模型组 Masson 染色( $\times 200$ ).

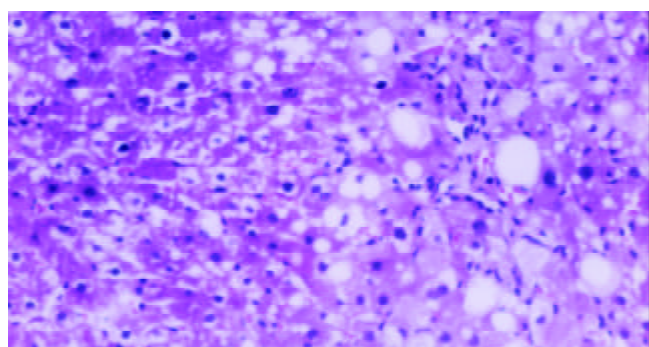


图3 牛磺酸治疗组 HE 染色切片( $\times 100$ ).

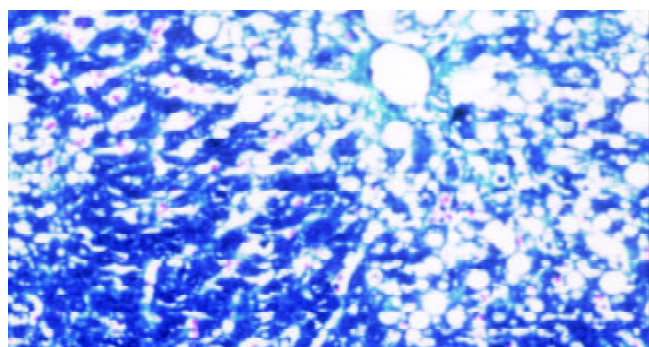


图4 牛磺酸治疗组 Masson 染色切片( $\times 200$ ).

### 3 讨论

肝纤维化常伴炎症, 可发展为肝硬化<sup>[11, 12]</sup>. 血清 HA, PC III 水平和肝组织 HYP 含量与肝组织纤维含量有良好的相关性, 可以作为反映肝纤维化程度的指标<sup>[13-15]</sup>. 而 HA 在目前所有肝纤维化血清学指标中是诊断价值最高的一个<sup>[16]</sup>. TGF- $\beta_1$  是作用最强的致肝纤维化细胞因子, TGF- $\beta_1$  的活化是大量细胞外间质合成的主要来源<sup>[17]</sup>. 为了准确的反映纤维化程度, 我们采用肝组织病理学检查和反映细胞外间质成分的 HA, PC III, HYP 以及反映纤维化形成的相关因子 TGF- $\beta_1$  进行联合检测.

CCl<sub>4</sub> 引起肝损害的作用机制主要是 CCl<sub>4</sub> 经肝微粒体内依赖于 Cyt.P450 的混合功能酶的激活, 产生了自由基 CCl<sub>3</sub> 及 Cl, 这些自由基可与肝细胞内大分子发生共价结合, 使肝细胞损伤. 此外, 二者均可导致微粒体钙泵活性降低, 使胞质 Ca<sup>2+</sup> 升高, 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 稳态遭到破坏, 从而引起细胞代谢紊乱甚至死亡<sup>[18-22]</sup>. 坏死物质及其继发的炎症细胞浸润产生肝纤维化刺激因子, 后者促进贮脂细胞 - 肌成纤维细胞 - 成纤维细胞增生, 产生大量胶原纤维, 形成肝纤维化<sup>[23, 24]</sup>. 因而, 抑制炎症的发生, 可阻止肝纤维化的进展. 肝组织的慢性炎症损伤和纤维化使肝功能障碍, 血浆总蛋白、白蛋白水平降低. 研究结果显示, 牛磺酸治疗组能显著提高血浆白蛋白水平, 降低 CCl<sub>4</sub> 导致的肝纤维化大鼠血清 ALT, HA, PC III 和肝组织 HYP 水平, 说明牛磺酸可减轻肝脏的炎症反应, 促进肝组织损伤的修复和改善功能, 同时抑制胶原蛋白及蛋白多糖的合成<sup>[4, 5, 25]</sup>. 本结果还显示, 经牛磺酸治疗后, 肝组织 TGF- $\beta_1$  表达显著下降, 与模型对照组比较差异有显著性, 说明牛磺酸可抑制 TGF- $\beta_1$  的活性, 拮抗 TGF- $\beta_1$  在肝纤维化形成中的作用. Cyt.P450 系统是位于滑面内质网上的一组混合功能氧化酶系, 他参与内源性物质和外源性物质代谢, 能够反映肝脏的解毒功能<sup>[26]</sup>. 本实验表明, 模型组大鼠 Cyt.P450 和 Cyt.b<sub>5</sub> 含量明显低于其他各组, 说明大鼠在形成肝纤维化时肝脏解毒功能明显下降, 而经牛磺酸干预后, 大鼠肝脏 Cyt.P450 和 Cyt.b<sub>5</sub> 含量明显增加, 解毒功能明显增强.

总之, 牛磺酸具有显著的防治实验性大鼠肝纤维化的作用. 其机制可能是通过拮抗 CCl<sub>4</sub> 的肝毒性作用, 抑制炎症, 保护肝细胞, 以及抑制 TGF- $\beta_1$  的活性有关.

### 4 参考文献

- 1 王吉耀. 关于肝纤维化研究的一些现状及展望. 中华消化杂志 1998;18:323
- 2 Lee HS, Huang GT, Chen CH, Chiou LL, Lee CC, Yang PM, Chen DS, Sheu JC. Less reversal of liver fibrosis after prolonged carbon tetrachloride injection. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1312-1315
- 3 Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992; 77:101-163
- 4 Birdsall TC. Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev* 1998;3:128-136
- 5 Balkan J, Dogru-Abbasoglu S, Kanbagli O, Cevikbas U, Aykac-

- Toker G, Uysal M. Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:251-254
- 6 Koyman I, Nakamura T, Ogasawara M, Nemoto M, Yoshida T. The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by the oxygen radical. *Adv Exp Med Biol* 1992; 315:335-339
- 7 Du G, Mouothys-Mickalad A, Sluse FE. Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med* 1998;25:1066-1074
- 8 Omura T, Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 1964;239:2370-2385
- 9 唐跃年, 张顺国, 李岚. 肝细胞微粒体的制备和细胞色素 P450 氧化酶活性测定. *中国医院药学杂志* 1998;18:535-536
- 10 周少春, 车建图, 李定国. 大鼠肝组织羟脯氨酸的测定. *上海第二医科大学学报* 1997;17:458-460
- 11 曾民德, 王泰龄, 王宝恩. 肝纤维化诊断和疗效评估共识. *诊断学理论与实践* 2002;1:191-192
- 12 陈岳祥, 李石. 肝纤维化药物治疗研究现状. *国外医学·消化系疾病分册* 1996;16:7-10
- 13 谢仕斌, 姚集鲁, 郑树森, 姚春谰, 郑荣琴. 血清肝纤维化指标水平与肝组织纤维图像分析的关系. *中华肝脏病杂志* 2000;8:203
- 14 高春芳, 叶伟民, 徐玲玲, 薛昌, 屠晓卿, 范烈英, 孔宪涛. 血清标志在慢性肝病肝纤维化诊断中的应用研究. *肝脏* 2000;5:203
- 15 Huang Z, Li Q, Wang Z. Observation on dynamic changes of serum procollagen III, hyaluronic acid and laminin in rats with hepatic fibrosis treated with Hujin pill. *Zhongguo Zhong Xiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:447-449
- 16 Housset C, Guechot J. Hepatic fibrosis: physiopathology and biological diagnosis. *Pathol Biol* 1999;47:886-894
- 17 Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003;38:281-288
- 18 沈杰. 几种常用肝毒剂致肝损伤机制的研究现状. *生理科学进展* 1990;21:70-72
- 19 Rechnagel RO, Glende EH Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 1973;2: 263-297
- 20 Huang R, Okuno H, Takasu M, Shiozaki Y, Inoue K. Protective effect of rifampicin against acute liver injury induced by Carbon tetrachloride in mice. *Jpn J Pharmacol* 1995;69:325-334
- 21 Chae HB, Jang LC, Park SM, Son BR, Sung R, Choi JW. An experimental model of hepatic fibrosis induced by alcohol and CCl<sub>4</sub>: can the lipopolysaccharide prevent liver injury induced by alcohol and CCl<sub>4</sub>? *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002;8: 173-178
- 22 Zim MC, Silveira TR, Schwartzmann G, Cerski T, Motta A. Potentiation of carbon tetrachloride hepatotoxicity by pentosan polysulfate in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:1339-1346
- 23 黄自平, 艾莉, 袁顺玉, 梁扩寰. 当归对 CCl<sub>4</sub> 所致肝损伤大鼠的抗肝纤维化作用. *中国病理生理杂志* 1996;12:152-154
- 24 Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2002;22:869-877
- 25 Chen Y, Li S, Zhang X. Taurine inhibits deposition of extracellular matrix in experimental liver fibrosis in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1999;7:165-167
- 26 Hung DY, Chang P, Cheung K, McWhinney B, Masci PP, Weiss M, Roberts MS. Cationic drug pharmacokinetics in diseased livers determined by fibrosis index, hepatic protein content, microsomal activity, and nature of drug. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1079-1087

# 胰腺移植 ICAM-1 的表达及信号转导的因素

梁 健, 王凤山, 刘永锋, 刘利民, 刘树荣, 崔 宏, 邵春泉, 何三光

梁健, 王凤山, 刘永锋, 刘树荣, 崔宏, 邵春泉, 何三光, 中国医科大学附属第一医院普外一科 辽宁省沈阳市 110001  
刘利民, 中国医科大学法医学院 辽宁省沈阳市 110001  
梁健, 男, 1954-12-29 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 博士, 副教授.  
辽宁省科委社发基金资助项目, No. 99225003  
辽宁省科委攻关课题资助项目, No. 00225001  
辽宁省教育厅高校科研项目, No. 202012014.  
项目负责人: 梁健, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科大学附属第一医院普外一科. liangj63110@vip.sina.com  
电话: 024-23265284 传真: 024-23388927  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-25

## Intercellular adhesion molecule-1 expression in pancreas graft and its signal transducer

Jian Liang, Feng-Shan Wang, Yong-Feng Liu, Li-Min Liu, Shu-Rong Liu, Hong Cui, Chun-Quan Tai, San-Guang He

Jian Liang, Feng-Shan Wang, Yong-Feng Liu, Shu-Rong Liu, Hong Cui, Chun-Quan Tai, San-Guang He, First Department of Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, 110001 Shenyang, Liaoning Province, China  
Li-Min Liu, Institute of Forensic Medicine, China Medical University, 110001 Shenyang, Liaoning Province, China  
Supported by the Society Development Foundation of Liaoning Province, No. 99225003 and the Key Programs of Science and Technology Commission of Liaoning Province, No.00225001 and Fund from the Higher Education Department of Liaoning Province, No.202012014  
Correspondence to: Dr. Jian Liang, 155 Nanjing Street, Shenyang, First Department of Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, 110001 Shenyang, Liaoning Province, China. liangj63110@vip.sina.com  
Received: 2003-03-08 Accepted: 2003-03-25

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on expression of intercellular adhesion molecule-1 and transduction signal after pancreasoduodenal transplantation in rats.

**METHODS:** ONO-5 046 was injected intravenously into experimental animal models. ICAM-1 mRNA transduction signals were detected in rat endothelial cells with regard to the effect of many reagents on expression of ICAM.

**RESULTS:** ICAM-1 mRNA level decreased in pancreatic grafts of experimental animals. ICAM-1 mRNA expression was increased in rat endothelial cells *in vitro* stimulated by NE, while that it could be inhibited by ONO-5046. Calcium ionophore enhanced ICAM-1 mRNA expression. In contrast, a phospholipase C inhibitor, calcium chelator and nuclear factor-kappa B inhibitor regulated down NE induction of ICAM-1 mRNA.

**CONCLUSION:** ICAM-1 expression stimulated by NE in pancreatic grafts may be associated with intracellular  $Ca^{2+}$

influx and a phospholipase C signal transduction.

Liang J, Wang FS, Liu YF, Liu LM, Liu SR, Cui H, Tai CQ, He SG. Intercellular adhesion molecule-1 expression in pancreas graft and its signal transducer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1396-1398

## 摘要

**目的:** 探讨中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)抑制剂对细胞间黏附因子-1 (ICAM-1)在大鼠胰腺移植物的表达及转导信号的影响。

**方法:** 采用大鼠胰十二指肠移植模型, 实验组给予NE抑制剂(ONO-5046, 10 mg/kg). 体外实验检测 NE 及多种相关试剂对大鼠内皮细胞ICAM-1mRNA表达的影响及基因转导信号的调控作用。

**结果:** 对照组胰腺移植植物中ICAM-1mRNA呈高水平表达, 而实验组经ONO-5046处理后明显下调其表达, 有显著性差异. NE 刺激大鼠内皮细胞上调 ICAM-1mRNA 表达水平, 而ONO-5046 则明显抑制其表达; 特异性钙离子载体增强该细胞的 ICAM-1mRNA 表达, 相反, 磷脂酶 C 抑制剂、钙离子螯合剂及核因子  $\kappa$ B 抑制因子则下调NE诱导的 ICAM-1mRNA表达水平。

**结论:** NE增强ICAM-1在胰腺移植植物的表达与细胞钙离子内流及磷脂酶C的信号转导有关。

梁健, 王凤山, 刘永锋, 刘利民, 刘树荣, 崔宏, 邵春泉, 何三光. 胰腺移植 ICAM-1 的表达及信号转导的因素. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1396-1398  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1396.asp>

## 0 引言

胰腺移植物的再灌注损伤性胰腺炎和移植植物血栓形成是胰腺移植早期移植失功的主要并发症. 中性粒细胞在缺血/再灌注损伤过程中起重要作用, 中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)是炎症组织损伤的一个重要递质, 而巨噬细胞分化抗原-1 (Mac-1)和细胞间黏附因子-1 (ICAM-1)等炎症因子也起着重要作用<sup>[1-9]</sup>. 我们曾报道NE抑制剂降低大鼠胰十二指肠移植再灌注后中性粒细胞趋化因子的表达<sup>[5]</sup>. 本研究探讨大鼠胰十二指肠移植再灌注损伤过程中 ICAM-1 在胰腺移植植物的表达以及 ICAM-1mRNA 基因信号转导的调控因素。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Wistar 大鼠, 体质量 250-300 g, 采用 Lee

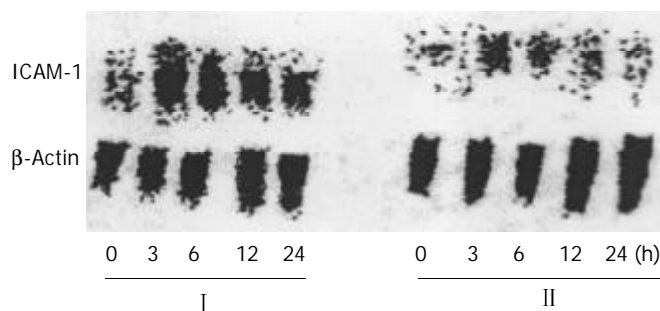
法大鼠异位胰十二指肠移植术. 实验组移植血管开放前静脉给予弹性蛋白酶抑制剂(ONO-5046)10 mg/kg, 对照组静脉给予等量生理盐水. 胰腺移植后 3, 6, 12, 24 h 各组分别处死 4 只动物, 取血及胰腺移植标本置低温冰箱保存待测. 特异性钙离子载体( $A_{23187}$ ) 2  $\mu\text{mol/L}$  (Sigma); 磷脂酶 C 抑制剂( $U_{73122}$ ) 5  $\mu\text{mol/L}$  (Biomol); 内质网钙释放阻滞剂(TMB-8) 50  $\mu\text{mol/L}$  (Biomol); 核转录因子- $\kappa\text{B}$  抑制剂(PDTC) 10  $\mu\text{mol/L}$  (Sigma); NE 抑制剂(ONO-5046) 10 mmol/L (日本熊本大学山口康雄副教授惠赠).

1.2 方法 免疫组化染色采用碱性磷酸酶法对胰腺移植行 ICAM-1 免疫组化染色, 应用图像分析仪(METAMORPH, USA)进行半定量分析(标准化单位). 通过预实验发现, 不同浓度的 NE 刺激 WK-5 细胞后 ICAM-1 mRNA 的表达水平呈剂量依赖性增加. 然而, 高浓度 NE (10 mg/L) 则导致 WK-5 细胞从细胞培养平板上剥离. 故采用 NE 5 mg/L 刺激 WK-5 细胞进行体外实验. 在 RPMI 1640 加 100 ml/L FCS 液中调整 WK-5 细胞浓度为  $10^6/\text{ml}$ , 於 24 孔培养板中, 在 50 ml/L  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 24 h. 对胰腺移植及 WK-5 细胞行 RNA 分离提取和 Northern blot 分析, 检测 ICAM-1 mRNA 的表达.

统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用统计学软件包对结果进行方差分析和 t 检验, 判断各组间差异显著性.

## 2 结果

移植后 24 h 胰腺移植物的免疫组化染色显示, 对照组的 ICAM-1 表达明显高于 ONO-5046 预处理的实验组, 彩色图像分析半定量结果, ICAM-1 在对照组胰腺移植中的表达值为  $82 \pm 11$ , 明显高于实验组的  $38 \pm 9$ , 两组间有显著性差异( $P < 0.01$ ). Northern blot 分析, 对照组胰腺移植 ICAM-1 mRNA 表达水平明显增高, 移植后 3 h 达高峰, 然后逐渐降低. 而实验组胰腺移植物的 ICAM-1 mRNA 表达水平明显降低( $P < 0.01$ , 图 1). NE



I 对照组; II 实验组.  
图 1 胰腺移植中 ICAM-1 mRNA 的表达.

加入 WK-5 细胞培养液后明显上调 ICAM-1 mRNA 表达水平, 而 ONO-5046 则明显抑制其表达, 两组间有显著性差异( $P < 0.01$ , 图 2). NE 加入 WK-5 细胞培养液后 ICAM-1 mRNA 表达水平(相对密度  $2.24 \pm 0.21$ ), 特异

性钙离子载体( $A_{23187}$ )增强 NE 刺激 WK-5 细胞的 ICAM-1 mRNA 表达水平(相对密度  $2.82 \pm 0.17$ ), 相反, 磷脂酶 C 抑制剂( $U_{73122}$ )则下调其表达(相对密度  $0.91 \pm 0.24$ ), 而内质网钙释放阻滞剂(TMB-8)和核转录因子- $\kappa\text{B}$  抑制剂(PDTC)明显抑制 NE 刺激 WK-5 细胞的 ICAM-1 mRNA 表达(相对密度分别为  $0.20 \pm 0.03$ 、 $0.17 \pm 0.02$ ), ONO-5046 同样抑制 NE 刺激 WK-5 细胞的 ICAM-1 mRNA 表达(相对密度  $0.84 \pm 0.16$ , 图 3).

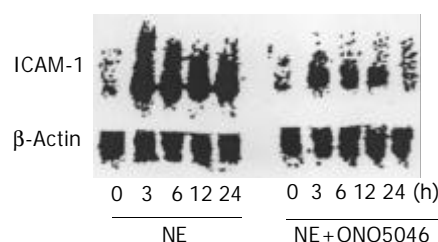
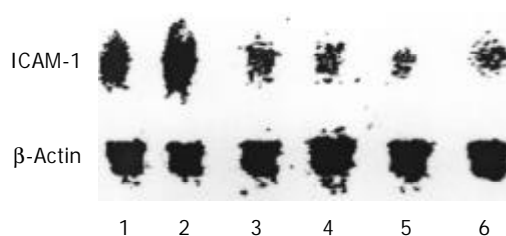


图 2 WK-5 细胞的 ICAM-1 mRNA 表达.



1 NE; 2  $A_{23187}$  + NE; 3  $U_{73122}$  + NE; 4 TMB-8 + NE; 5 PDTC + NE; 6 ONO5046 + NE.  
图 3 不同试剂对 WK-5 细胞 ICAM-1 mRNA 表达的影响.

## 3 讨论

本实验证明 NE 抑制剂 ONO-5046 明显抑制大鼠胰十二指肠移植再灌注后胰腺移植中 ICAM-1 蛋白和基因的表达. 有报道, ONO-5046 对犬心脏移植的缺血再灌注损伤亦有保护作用<sup>[10]</sup>. 人们从不同角度进行研究取得了满意的成果<sup>[11-14]</sup>. 本研究体外实验提示, NE 上调内皮细胞 ICAM-1 mRNA 的表达水平. 受体-G 蛋白-磷脂酶 C (PLC) 复合物被膜磷脂酰肌醇 (PI) 酶切形成第 2 信使二酯甘油 (DG) 和三磷酸肌醇 ( $\text{IP}_3$ ). 由 PLC 作用的  $\text{IP}_3$  水解可通过刺激受体或通过  $\text{Ca}^{2+}$  通道的开放来调节<sup>[15, 16]</sup>. 细胞间  $\text{IP}_3$  和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的增加可被 PLC 抑制剂  $U_{73122}$  剂量依赖性抑制. 弹性蛋白酶增强  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 从而导致 PLC 的激活. 这些结果提示, 在弹性蛋白酶的作用下, ICAM-1 的表达可能与细胞  $\text{Ca}^{2+}$  内流和磷脂酶 C 的激活有关. 本实验通过弹性蛋白酶刺激大鼠内皮细胞, 探讨 ICAM-1 基因表达的信号转导机制.

实验结果提示: NE 明显增加内皮细胞的 ICAM-1 mRNA 表达, 而 NE 抑制剂 ONO-5046 则抑制其表达;  $\text{Ca}^{2+}$  特异性载体  $A_{23187}$  上调内皮细胞 ICAM-1 mRNA 的表达, 而  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 TMB-8 则明显下调其表达; PLC 的活性是  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性的, PLC 抑制剂  $U_{73122}$  可以抑制由 NE 刺激内皮细胞的 ICAM-1 mRNA 水平的增高, 证明 PLC 参与调节 ICAM-1 基因启动子在大鼠内皮细胞表



达的信号转导且与  $\text{Ca}^{2+}$  内流密切相关. 当白细胞、单核细胞表面的黏附因子(Mac-1)与细胞外基质结合后, 可激活细胞内的信号转导途径, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增高是白细胞迁移所必需的, 而内皮细胞表面的 ICAM-1 介导了白细胞穿越毛细血管壁达到炎症损伤部位的黏附和浸润过程<sup>[17]</sup>. 抑制蛋白酶活性对防止中性粒细胞迁移以及局部或远隔器官损伤是有效的<sup>[18]</sup>. 缺血、细胞内钙超载是移植物失功的重要因素<sup>[19]</sup>. 实验研究发现, 缺氧使移植物细胞内 ATP 耗竭, 导致细胞内钠、钾、钙离子紊乱<sup>[20]</sup>.

胰腺缺血再灌注损伤可导致微循环障碍<sup>[21]</sup>. 乏氧、缺血再灌注损伤可通过酪氨酸磷酸化依赖性通道活化 NF- $\kappa\text{B}$ <sup>[22]</sup>, 后者可与多种炎症因子基因启动子的  $\kappa\text{B}$  序列结合, 参与炎症递质、黏附因子基因的转录. 这些炎症递质可以活化内皮细胞、单核巨噬细胞、白细胞, 释放氧自由基、NE 等物质进一步加重组织损伤. NF- $\kappa\text{B}$  介导多种免疫调节因子的表达, I $\kappa\text{B}\alpha$  是 NF- $\kappa\text{B}$  的主要抑制因子. 增加细胞间钙离子信号传导通路能激活  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性蛋白酶, 他使 I $\kappa\text{B}\alpha$  蛋白溶解<sup>[23-29]</sup>. ICAM-1 基因 5' 调节区域有 NF- $\kappa\text{B}$  结合位点, 信号转导因子可与之结合而影响 ICAM-1 基因的转录. 本研究证明 NF- $\kappa\text{B}$  抑制剂 PDTC 明显抑制 NE 诱导的 ICAM-1 mRNA 表达水平. NE 的蛋白分解增加了内皮细胞的通透性, 并且是内皮细胞变形和分离的最有效的蛋白酶之一. 在大鼠胰腺移植缺血再灌注后早期 NE 明显增强 IL-8/CINC mRNA 表达, 并上调 ICAM-1 在内皮细胞的表达.

#### 4 参考文献

- Nakae H, Endo S, Sato N, Wakabayashi G, Inada K, Sato S. Involvement of soluble adhesion molecules in acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 2001;33:377-382
- Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2:496-501
- Menger MD, Plusczyk T, Vollmar B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:187-194
- Telek G, Ducroc R, Scoazec JY, Pasquier C, Feldmann G, Roze C. Differential upregulation of cellular adhesion molecules at the sites of oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001;96:56-67
- 王凤山, 梁健, 刘永锋, 何三光. 大鼠全胰十二指肠移植后 IL-8/CINC 的变化. *中国医科大学学报* 1999;28:20-24
- Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001;128:13-16
- Bhatnagar A, Wig JD, Majumdar S. Expression of activation, adhesion molecules and intracellular cytokines in acute pancreatitis. *Immunol Lett* 2001;77:133-141
- Zaninovic V, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Mouria M, Pandol SJ. Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G666-676
- Otsuka M, Takada Y, Fukunaga K, Taniguchi H, Todoroki T. Activation of intracellular neutrophil elastase in the transplantation of ischemic liver. *Eur Surg Res* 2001;33:355-360
- Ueno M, Moriyama Y, Toda R, Yotsumoto G, Yamamoto H, Fukumoto Y, Sakasegawa K, Nakamura K, Sakata R. Effect of a neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046 Na) on ischemia/reperfusion injury using the left-sided heterotopic canine heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:889-896
- Rose NL, Palcic MM, Helms LM, Lakey JR. Evaluation of Pefabloc as a serine protease inhibitor during human-islet isolation. *Transplantation* 2003;75:462-466
- Li YY, Li XL, Yang CX, Zhong H, Yao H, Zhu L. Effects of Tetradrine and QYT on ICAM-1 and SOD gene expression in pancreas and liver of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:155-159
- Salem MZ, Cunha JE, Coelho AM, Sampietri SN, Machado MC, Penteado S, Abdo EE. Effects of octreotide pretreatment in experimental acute pancreatitis. *Pancreatol* 2003;3:164-168
- Meyer KC, Nunley DR, Dauber JH, Iacono AT, Keenan RJ, Cornwell RD, Love RB. Neutrophils, unopposed neutrophil elastase, and alpha1-antiprotease defenses following human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:97-102
- Srinivasan S, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M, Permutt MA. Glucose promotes pancreatic islet beta-cell survival through a PI 3-kinase/Akt-signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E784-793
- Halonen J, Nedergaard J. Adenosine 5' -monophosphate is a selective inhibitor of the brown adipocyte nonselective cation channel. *J Membr Biol* 2002;188:183-197
- Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del Castillo C, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL. Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 1999;229:834-840
- Hartwig W, Jimenez RE, Fernandez-del Castillo C, Kelliher A, Jones R, Warshaw AL. Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Ann Surg* 2001;233:371-378
- Crenesse D, Neuilly G, Gugenheim J, Ferre C, Hugues M. Mapacalcine specifically blocks hypoxia-induced calcium influx in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 2003;270:1952-1957
- Carlsson PO, Kozlova I, Andersson A, Roomans GM. Changes in intracellular sodium, potassium, and calcium concentrations in transplanted mouse pancreatic islets. *Transplantation* 2003;75:445-449
- Fitzal F, DeLano FA, Young C, Rosario HS, Schmid-Schonbein GW. Pancreatic protease inhibition during shock attenuates cell activation and peripheral inflammation. *J Vasc Res* 2002;39:320-329
- Beraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:429-434
- Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1197-208
- Hietaranta AJ, Singh VP, Bhagat L, van Acker GJ, Song AM, Mykoniatis A, Steer ML, Saluja AK. Water immersion stress prevents caerulein-induced pancreatic acinar cell nf-kappa b activation by attenuating caerulein-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  changes. *J Biol Chem* 2001;276:18742-18747
- McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, Cuzzocrea S, Abdelrahman M, Harwood S, Plevin R, Chatterjee PK, Yaqoob MM, Thiemeermann C. Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB J* 2001;15:171-186
- Jaffray C, Mendez C, Denham W, Carter G, Norman J. Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha: role of nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B proteins. *J Gastrointest Surg* 2000;4:370-377
- Kim H, Seo JY, Roh KH, Lim JW, Kim KH. Suppression of NF-kappaB activation and cytokine production by N-acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med* 2000;29:674-683
- Giannoukakis N, Rudert WA, Trucco M, Robbins PD. Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor. *J Biol Chem* 2000;275:36509-36513
- Han B, Logsdon CD. CCK stimulates mob-1 expression and NF-kappaB activation via protein kinase C and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C344-351



# 聚乙二醇 4000 治疗老年人功能性便秘 85 例

张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其

张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其, 泉州市第一医院消化内科  
福建省泉州市 362000  
项目负责人: 张长青, 362000, 福建省泉州市, 泉州市第一医院消化内科.  
zcqing@pub2.qz.fj.cn  
电话: 0595-2861258  
收稿日期: 2003-03-07 接受日期: 2003-03-25

## Clinical evaluation of polyethylene glycol 4000 in treatment of functional constipation in elderly patients

Chang-Qing Zhang, Guo-Wei Zhang, Kui-Ling Zhang, Yi-Qi Fu

Chang-Qing Zhang, Guo-Wei Zhang, Kui-Ling Zhang, Yi-Qi Fu, Department of Gastroenterology, The First Hospital of Quanzhou, Quanzhou 362000, Fujian Province, China  
Correspondence to: Chang-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, The First Hospital of Quanzhou, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. zcqing@pub2.qz.fj.cn  
Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-03-25

## Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and safety of polyethylene glycol (PEG) 4000 in the treatment of elderly functional constipation in comparison with lactulose.

**METHODS:** A total of 85 patients with functional constipation were enrolled in this randomized and comparative trial. They received either PEG 4 000 (10 g,  $n = 41$ ) or lactulose (15 ml,  $n = 44$ ) for 2-4 weeks.

**RESULTS:** The complete remission of constipation was significantly higher in patients treated with PEG 4 000 in comparison with lactulose group (2 wk: 63.6 % vs 39.0 %,  $P < 0.01$ ; 4 wk: 69.0 % vs 42.1 %,  $P < 0.01$ ). The mean Bristol score of stool consistency during the 4 wk treatment was higher in the PEG group ( $4.0 \pm 0.3$  vs  $2.9 \pm 0.2$ ,  $P < 0.01$ ). At the end of 4 wk study, PEG 4 000 normalized the stool consistency in 81.5 % patients (lactulose group: 52.4 %,  $P < 0.01$ ). Thus, PEG 4 000 was more effective in alleviating abdominal pain and difficult defecation than lactulose. The side-effect incidences were 11.7 % and 16.1 % in the two groups respectively ( $P > 0.05$ ). There was no severe side-effect in both groups.

**CONCLUSION:** PEG 4 000 is an effective and safe agent in the treatment of elderly functional constipation.

Zhang CQ, Zhang GW, Zhang KL, Fu YQ. Clinical evaluation of polyethylene glycol 4000 in treatment of functional constipation in elderly patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1399-1401

## 摘要

**目的:** 进一步探讨聚乙二醇(PEG) 4 000对治疗老年人功能性便秘的疗效和安全性。

**方法:** 本试验采用随机、平行对照试验。85例功能性便秘患者随机分为试验组和对照组, 分别接受PEG 4 000 (10 g, 2次/d,  $n = 41$ )和乳果糖(15 ml, 2次/d,  $n = 44$ )治疗, 疗程2-4 wk。观察排便次数和大便性状的变化。

**结果:** 治疗2 wk后试验组和对照组的总有效率(93.1 % vs 87.8 %), 4 wk总有效率(95.4 % vs 86.8 %), 均无显著性差异; 但2 wk和4 wk显效率试验组明显高于对照组(63.6 % vs 39.0 %,  $P < 0.01$ ; 69.0 % vs 42.1 %,  $P < 0.01$ )。治疗期间试验组和对照组平均Bristol大便性状计分分别为 $4.01 \pm 0.32$ 和 $2.89 \pm 0.15$  ( $P < 0.01$ ); 4 wk治疗结束时, 试验组81.5 %患者大便状态保持正常, 对照组52.4 % ( $P < 0.01$ )。用药2 wk和4 wk时试验组腹痛、排便困难的缓解率优于对照组(90.4 % vs 59.2 %,  $P < 0.01$ ; 87.5 % vs 47.2 %,  $P < 0.01$ 和91.2 % vs 59.2 %,  $P < 0.01$ ; 74.2 % vs 53.1 %,  $P < 0.01$ )。二组不良反应的发生率分别为13.6 %和17.0 % ( $P > 0.05$ ), 均无严重不良反应发生。

**结论:** PEG4000是一种治疗老年人功能性便秘有效、安全的药物。

张长青, 张国伟, 张葵玲, 付奕其. 聚乙二醇 4 000 治疗老年人功能性便秘 85 例. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1399-1401

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1399.asp>

## 0 引言

慢性便秘是常见的消化道症状, 如广州地区成人慢性便秘患病率为3.0 %<sup>[1]</sup>。其中功能性便秘的主要病理生理学改变为结肠通过时间延长, 发生率随年龄增长而增加。研究显示, 亚洲地区老年功能性便秘的发生率约11 %<sup>[2, 3]</sup>。由于便秘常严重的影响与健康相关的生活质量<sup>[4]</sup>, 部分便秘患者并出现明显的敌意<sup>[5]</sup>, 显示其发病存在着明显的社会心理因素, 因此引起消化界及社会的日益关注。除了一些严重的便秘患者(如结肠无动力、盆腔裂孔疝等)需进行手术治疗外<sup>[6, 7]</sup>, 大部分通过内科治疗可以缓解, 其中渗透性轻泻剂聚乙二醇(PEG) 4 000对慢性便秘具有明显的疗效<sup>[8]</sup>。为了进一步比较PEG 4 000和乳果糖在治疗老年慢性功能性便秘的特点和安全性, 我们进行了随机对照临床研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 年龄60-75岁门诊患者, 便秘3 mo以上, 1 wk内自发的(即不用泻药的)排便次数小于或等于2次;

至少有 1/4 的时间排便不畅或排出硬质粪便和 / 或排便困难、费力; 近 1 a 内曾做过结肠镜或钡灌肠检查, 除外大肠器质性病变; 近 1 mo 内粪便常规和隐血试验无异常. 85 例患者, 男 38 例, 女 47 例; 年龄  $66.8 \pm 11.4$  岁; 病程  $13 \pm 9.3$  mo.

**1.2 方法** PEG 4 000 试验组( $n=41$ )和乳果糖对照组( $n=44$ ), 2 组患者年龄、性别、病程、入组前大便性状分型、既往用药情况等均无统计学差别. 入组前 2 组患者腹胀、腹痛、排便困难、食欲不振的伴随率分别为 43.2 %、21.1 %、53.2 %、26.0 % 和 42.5 %、23.3 %、56.1 %、25.3 %, 两组比较均无显著性差别. 5 例患者(试验组 2 例, 对照组 3 例)未能完成 2 wk 治疗被视为中途退出. 试验组服用 PEG 4 000 (商品名: 福松, Forlax® 天津博福 - 益普生制药有限公司), 10 g, 以一杯 200 ml 水化服, 2 次 /d; 对照组服用乳果糖口服液(丹东市康复制药厂), 15 ml / 次, 2 次 /d. 试验用药均在早餐、晚餐后服用. 疗程为 4 wk, 如患者用药后症状缓解和(或)患者不愿意继续服药, 可在用药 2 wk 后结束试验. 试验期间不服用其他通便药. 记录每日的有效排便次数, 根据 Bristol 大便性状图谱记录大便性状(Bristol 大便性状分型: 1 型为分离的硬团, 2 型为团块状, 3 型为干裂的香肠状, 4 型为柔软的香肠状, 5 型为软的团块, 6 型为泥浆状, 7 型为水样便. 其中 1、2、3 型为异常; 4、5 型为正常); 记录腹痛、腹胀、排便困难、食欲不振等症状; 治疗前及治疗结束后检查血、尿、粪常规、血电解质及肝肾功能. 分别在服药 2 wk 和 4 wk 末进行疗效评估.

**疗效评判标准:** 显效为治疗后大便次数及性状均恢复正常; 良效为治疗后大便性状或次数恢复正常; 有效为大便次数及性状均未恢复正常, 但较前有所改善; 无效为大便次数及性状均无改善. 总有效率 = 显效率 + 良效率. 便秘伴随症状的改善由缓解率表示, 缓解率是指便秘伴随症状评分在治疗 2 wk 和 4 wk 末较治疗前减低的患者数与治疗前有此症状的患者数之比. 试验中出现的不良事件均详细记录在不良事件表上, 按国家临床试验管理规范的有关规定, 分为有关、可能有关、不能判定、可能无关、无关 5 级. 其中严重不良事件定义为: 导致患者死亡或残疾的, 导致住院或住院日延长的.

**统计学处理** 用 SPSS11 for windows 对数据作统计学分析. 计量资料比较用非配对  $t$  检验或秩和检验; 计数资料比较用  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

**2.1 粪便性状改善情况** 2 组患者(0.81 vs 0.55 次 /d)排便次数在治疗的第 1 wk 逐日增加. 试验组到用药后第 7-8 d 时, 接近每日规律排便 1 次, 在此后 3 wk 的治疗中, 大便次数 (0.96 vs 0.75 次 /d) 保持在接近 1 次 /d, 两组间  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ . 治疗 2 wk 后, 试验组大便性状恢复正常者为 69.8 %, 对照组为 40.2 % ( $P < 0.05$ ). 4 wk

结束后, 试验组 81.5 % 患者大便状态保持正常, 对照组 52.4 % ( $P < 0.01$ ). 2 组患者治疗期大便分型平均计分分别为试验组  $4.01 \pm 0.32$ , 对照组  $2.89 \pm 0.15$  ( $P < 0.01$ ). 治疗 2 wk 和 4 wk 时 2 组显效(63.6 % vs 39.0 %,  $P < 0.01$ ; 69.0 % vs 42.1 %,  $P < 0.01$ ).

**2.2 伴随症状好转情况** 治疗 2 wk 试验组患者腹胀、腹痛、排便困难、食欲不振 4 项症状缓解率分别为 67.8 %、90.4 %、87.5 % 和 62.7 %; 对照组分别为 50.3 %、59.2 %、47.2 % 和 55.7 %, 经  $\chi^2$  检验, 试验组腹胀、排便困难的缓解率明显高于对照组( $P < 0.01$ ). 经 4 wk 治疗试验组患者腹胀、腹痛、排便困难 4 项症状缓解率分别为 73.2 %、91.2 %、74.2 % 和 81.5 %, 对照组分别为 67.1 %、59.2 %、53.1 % 和 71.5 %, 组间比较经  $\chi^2$  检验试验组腹胀、排便困难的缓解率明显高于对照组( $P < 0.01$ ).

**2.3 副反应** 2 组治疗前和治疗 4 wk 后肝功能、肾功能、电解质比较无显著性差异( $P < 0.01$ ), 同时 2 组均无发生肝功能、肾功能及电解质异常. 试验组 44 例患者中出现副反应 6 例(13.6 %), 包括腹胀 2 例、肠鸣 2 例、稀便 2 例, 其中 2 例因严重腹胀等退出研究. 对照组 41 例患者中 7 例出现副反应(17.0 %), 包括腹胀 3 例、肠鸣 1 例、排气多 1 例及头晕 2 例, 其中 1 例因严重腹胀、2 例因头晕症状退出研究. 2 组间的副反应发生率无显著性差异( $P > 0.05$ ).

## 3 讨论

慢性功能性便秘的病因是多因素的, 患者结肠通过时间延长的发病机制尚不十分清楚, 可能与直肠低敏感性、结肠壁中的内分泌细胞改变、结肠肌间神经丛病理改变及复杂的社会心理因素有关<sup>[5,9-15]</sup>, 但直肠动力学特征则无明显改变<sup>[16]</sup>. 治疗应缓解主要的症状, 并治疗潜在的病理生理改变<sup>[17]</sup>. 部分患者可通过改变饮食习惯(如增加纤维素及水份)使便秘得以缓解<sup>[2,18]</sup>, 而饮苏打水(carbonated water)则可减少食欲, 加重消化不良及便秘等症<sup>[19]</sup>. 在功能性便秘治疗中, 渗透性轻泻剂显示出其明显的优越性, 而逐渐受到重视<sup>[20, 21]</sup>.

PEG 是一种长链高分子聚合物, 在消化道内不被吸收或代谢, 不影响脂溶性维生素的吸收和电解质的代谢, 属于渗透性缓泻剂. 一般认为其通过氢键结合并固定肠腔内固有的水分子, 增加粪便的含水量, 减少粪便硬度, 而改善便秘症状, 但并不影响口 - 肛通过时间、结肠的转运时间和左半结肠的动力<sup>[22, 23]</sup>, 但对慢通过型便秘则可改善结肠通过时间<sup>[24]</sup>. 目前 PEG 4 000 及 PEG3350 已成为治疗功能性便秘的最常用药物<sup>[25-29]</sup>, 研究表明, 标准剂量的 Forlax 对肠道功能性改变所致便秘效果最好, 且较少引起水样便, 对粪便嵌顿者则需增大剂量, 对如严重糖尿病伴发的便秘, 应增加促动力药治疗以达更好疗效<sup>[26, 29]</sup>. 长期服用 PEG 类缓泻剂不存在安全问题<sup>[30-32]</sup>, 并较乳果糖有较好的耐受性且费用较低<sup>[25, 27, 28]</sup>.

本研究对 85 例老年功能性便秘患者进行 2-4 wk 对照观察结果表明, 患者服用 PEG 4 000 (Forlax) 后排便次数逐日增加, 治疗 1wk 后可接近每天排便 1 次; 治疗 2 wk 和 4 wk 后大便性状恢复正常的比例明显高于乳果糖组 ( $P < 0.05-0.01$ ); 2 组治疗后大便分型平均计分比较 PEG 4 000 组高于乳果糖组 ( $P < 0.01$ )。综合排便次数和大便性状二项指标, 我们认为 PEG 4 000 和乳果糖对老年功能性便秘均具有良好的治疗效果, 两组 2 wk 和 4 wk 治疗总有效率比较虽无显著性差异, 但显效率存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 这与 PEG 4 000 能有效改善便秘患者的大便性状有关。我们还发现 PEG 4 000 在改善便秘患者排便次数和大便性状的同时, 能有效缓解患者腹胀、腹痛、排便困难、食欲不振等伴随症状, PEG 4 000 组在服药 2 wk 和 4 wk 时对腹痛、排便困难的缓解率明显优于乳果糖组 ( $P < 0.01$ )。在副反应方面, 文献[32]曾有引起胰腺炎的报告, 本研究显示 2 组均无严重不良事件的病例出现, 副反应的发生率两组无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。因此, PEG 4 000 是一种治疗老年功能性便秘的安全、有效的药物。

#### 4 参考文献

- 1 尉秀清, 陈旻湖, 王锦辉, 胡品津. 广州市居民肠易激综合征及功能性便秘的流行病学调查. 中华内科杂志 2001;40:517-520
- 2 Wong ML, Wee S, Pin CH, Gan GL, Ye HC. Sociodemographic and lifestyle factors associated with constipation in an elderly Asian community. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1283-1291
- 3 于普林, 李增金, 郑宏, 朱汉民, 李玺, 何钦成, 王静思, 袁凯瑜, 姜中央, 段春波, 高芳堃. 老年人便秘流行病学特点的初步分析. 中华老年医学杂志 2001;20:132-134
- 4 Irvine EJ, Ferrazzi S, Pare P, Thompson WG, Rance L. Health-related quality of life in functional GI disorders: focus on constipation and resource utilization. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1986-1993
- 5 Dumitrascu DL, Acalovschi M, Pascu O. Hostility in patients with chronic constipation. *Rom J Intern Med* 1998;36:239-243
- 6 Lahr SJ, Lahr CJ, Srinivasan A, Clerico ET, Limehouse VM, Serbezov IK. Operative management of severe constipation. *Am Surg* 1999;65:1117-1121
- 7 Sarli L, Costi R, Sarli D, Roncoroni L. Pilot study of subtotal colectomy with antiperistaltic cecoproctostomy for the treatment of chronic slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1514-1520
- 8 周丽雅, 夏志伟, 林三仁, 王惠吉, 于中麟, 黄乃侠, 吕宗舜, 胡伏莲, 陈宝雯, 王化虹. 聚乙二醇 4 000 治疗成人慢性功能性便秘的多中心随机对照临床试验研究. 中国临床药理学杂志 2001;17:7-10
- 9 Gladman MA, Scott SM, Chan CL, Williams NS, Lunniss PJ. Rectal hyposensitivity: prevalence and clinical impact in patients with intractable constipation and fecal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2003;46:238-246
- 10 El-Salhy M, Norrgard O, Spinnell S. Abnormal colonic endocrine cells in patients with chronic idiopathic slow-transit constipation. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1007-1011
- 11 Stewart WF, Liberman JN, Sandler RS, Woods MS, Stemhagen A, Chee E, Lipton RB, Farup CE. Epidemiology of constipation (EPOC) study in the United States: relation of clinical subtypes to sociodemographic features. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3530-3540
- 12 Mertz H, Naliboff B, Mayer E. Physiology of refractory chronic constipation. *Am J Gastroenterol* 1999;94:609-615
- 13 肖文斌, 刘玉兰, 赵丽莉. 腹泻型、便秘型肠易激综合征和功能
- 性便秘患者的直肠感觉阈值比较. 世界华人消化杂志 2002;10:1291-1294
- 14 田波, 杨世玲, 李云华, 段全红, 陈国庭, 厉峰, 马善符. 慢传输型便秘结肠神经病理改变的意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1385-1388
- 15 高峰, 张胜本, 张连阳, 蔡文琴, 童卫东, 李发智, 李文惠. 慢传输型便秘结肠肌间神经丛超微结构改变. 世界华人消化杂志 1999;7:1049-1051
- 16 Penning C, Steens J, van der Schaar PJ, Kuyvenhoven J, Delemarre JB, Lamers CB, Masclee AA. Motor and sensory function of the rectum in different subtypes of constipation. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:32-38
- 17 De Lillo AR, Rose S. Functional bowel disorders in the geriatric patient: constipation, fecal impaction, and fecal incontinence. *Am J Gastroenterol* 2000;95:901-905
- 18 Anti M, Pignataro G, Armuzzi A, Valenti A, Iascone E, Marmo R, Lamazza A, Pretaroli AR, Pace V, Leo P, Castelli A, Gasbarrini G. Water supplementation enhances the effect of high-fiber diet on stool frequency and laxative consumption in adult patients with functional constipation. *Hepatogastroenterology* 1998;45:727-732
- 19 Cuomo R, Grasso R, Sarnelli G, Capuano G, Nicolai E, Nardone G, Pomponi D, Budillon G, Ierardi E. Effects of carbonated water on functional dyspepsia and constipation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:991-999
- 20 Proceedings of an international workshop on polyethylene glycol (PEG) solutions in the treatment of chronic constipation. Rome, Italy. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(Suppl 3):S231-S265
- 21 Richard GL, John HP, Sidney FT. AGA technical review on constipation. *Gastroenterology* 2000;119:1766-1778
- 22 Chaussade S. Mechanisms of action of low doses of polyethylene glycol in the treatment of functional constipation. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(Suppl 3):S242-S244
- 23 Herve S, Leroi AM, Mathiex-Fortunet H, Garnier P, Karoui S, Menard JF, Ducrotte P, Denis P. Effects of polyethylene glycol 4 000 on 24 h manometric recordings of left colonic motor activity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:647-654
- 24 Bassotti G, Fiorella S, Roselli P, Modesto R. Use of polyethylene glycol solution in slow transit constipation. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(Suppl 3):S255-256
- 25 Ferguson A, Culbert P, Gillett H, Barras N. New polyethylene glycol electrolyte solution for the treatment of constipation and faecal impaction. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(Suppl 3):S249-S252
- 26 Chaussade S, Minic M. Comparison of efficacy and safety of two doses of two different polyethylene glycol-based laxatives in the treatment of constipation. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:165-172
- 27 Attar A, Lemann M, Ferguson A, Halphen M, Boutron MC, Flourie B, Alix E, Salmeron M, Guillemot F, Chaussade S, Menard AM, Moreau J, Naudin G, Barthet M. Comparison of a low dose polyethylene glycol electrolyte solution with lactulose for treatment of chronic constipation. *Gut* 1999;44:226-230
- 28 Christie AH, Culbert P, Guest JF. Economic impact of low dose polyethylene glycol 3350 plus electrolytes compared with lactulose in the management of idiopathic constipation in the UK. *Pharmacoeconomics* 2002;20:49-60
- 29 Rudenko NN, Dorofeev AE, Agibalov AN, Nechipurenko TB, Andrienko IN, Muzychenko LA. Forlax in the treatment of chronic constipation of different origins. *Lik Sprava* 2000;(3-4):94-96
- 30 Corazziari E, Badiali D, Bazzocchi G, Bassotti G, Roselli P, Mastropaolo G, Luca MG, Galeazzi R, Peruzzi E. Long term efficacy, safety, and tolerability of low daily doses of isosmotic polyethylene glycol electrolyte balanced solution (PMF-100) in the treatment of functional chronic constipation. *Gut* 2000;46:522-526
- 31 Badiali D, Corazziari E. Use of low dose polyethylene glycol solutions in the treatment of functional constipation. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31(Suppl 3):S245-S248
- 32 Franga DL, Harris JA. Polyethylene glycol-induced pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2000;52:789-791

# 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗

程英升

程英升, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233  
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

编者按 胃肠道肿瘤是指发生在咽、食管、胃、十二指肠、小肠、结肠和直肠的良恶性肿瘤。据统计,我国男、女性前5位肿瘤死因分别是胃癌、食管癌、肝癌、肺癌、结直肠癌和胃癌、宫颈癌、食管癌、肝癌、肺癌,可见胃肠道肿瘤特别是恶性肿瘤是我国肿瘤患者死亡的主要原因之一,严重危害我国人民健康。1980年代初,由于我国对胃肠道肿瘤影像诊断的重视,特别在早期胃肠道恶性肿瘤钡剂造影诊断方面取得较大突破。近年来,随着医学科学的不断发展,仪器设备的不断更新换代,特别是新的成像技术不断涌现,为胃肠道肿瘤的全面综合影像诊断和微创介入治疗取得新的突破创造了条件。为了加强这个领域的基础理论和临床应用研究,普及胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗方面的新理论、新技术、新方法,本刊特邀有关专家就胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗问题,结合自己的研究和临床应用经验,进行系统介绍和讨论,以飨读者。

1	胃肠道肿瘤的X线诊断.....	1402
2	胃肠道肿瘤CT诊断.....	1404
3	胃肠道肿瘤MRI诊断.....	1406
4	胃肠道肿瘤超声诊断.....	1408
5	胃肠道肿瘤核素诊断.....	1410
6	胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗.....	1413

## 胃肠道肿瘤的X线诊断

尚克中, 程英升, 吴春根

尚克中, 程英升, 吴春根, 上海交通大学附属第六人民医院放射科  
上海市 200233  
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

尚克中, 程英升, 吴春根. 胃肠道肿瘤的X线诊断. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1402-1404

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1402.asp>

### 0 引言

胃肠道肿瘤的X线诊断主要包括透视、平片、造影等成像技术。造影又分单对比、双对比造影。双对比造影(double contrast radiography, DC)经过多年的不断改进和完善,已发展成为现代双对比造影。由于现代双对比造影对胃肠道病变的诊断具有方便、快捷、准确等优点,多年来得到广泛应用,并一直作为胃肠道肿瘤诊断的基本方法之一。

### 1 面临挑战中的双对比造影新进展

近20a来,以现代DC为代表的钡剂造影或钡检(barium radiography, barium examination)作为显示胃肠道器官病变的基本诊断手段,经历了迅速提高、蓬勃发展、几乎没有竞争对手的鼎盛时期之后,近10a来已逐渐转入到面临主要来自内镜和其他影像手段的挑战和竞争,逐渐丧失优势的危机时期。

面对严峻的挑战,许多专家承认钡检确实存在不少严重问题,指出钡检“如不改进,有被淘汰的可能”,并不断努力,在许多方面取得了令人瞩目的新进展<sup>[1-20]</sup>。

1.1 价值和表现 DC的表现及其与病变病理改变的对照研究<sup>[21-23]</sup>,近年仍常有新发现,其中较有价值者有:(1)胃窦幽门肥大皱襞的意义。1999年Arora et al<sup>[24]</sup>在1796例胃DC片选出有胃-幽门肥大皱襞者进行分析:肥大皱襞呈黏膜下平整块状者37(92%)例,证实其非为肿瘤,认为此表现不需再作内镜及活检。另有报道认为CT检查发现胃窦有粗大皱襞时应再作DC检查而不必做内镜;(2)胃和十二指肠粗大息肉状或结节状皱襞与炎症和幽门螺杆菌有密切关系;(3)7例胃非息肉性腺瘤中的4例表现为边缘凹陷,瘤体平坦或脐状凹陷,在双对比

# 胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗

程英升

程英升, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233  
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

编者按 胃肠道肿瘤是指发生在咽、食管、胃、十二指肠、小肠、结肠和直肠的良恶性肿瘤。据统计,我国男、女性前5位肿瘤死因分别是胃癌、食管癌、肝癌、肺癌、结直肠癌和胃癌、宫颈癌、食管癌、肝癌、肺癌,可见胃肠道肿瘤特别是恶性肿瘤是我国肿瘤患者死亡的主要原因之一,严重危害我国人民健康。1980年代初,由于我国对胃肠道肿瘤影像诊断的重视,特别在早期胃肠道恶性肿瘤钡剂造影诊断方面取得较大突破。近年来,随着医学科学的不断发展,仪器设备的不断更新换代,特别是新的成像技术不断涌现,为胃肠道肿瘤的全面综合影像诊断和微创介入治疗取得新的突破创造了条件。为了加强这个领域的基础理论和临床应用研究,普及胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗方面的新理论、新技术、新方法,本刊特邀有关专家就胃肠道肿瘤的影像诊断和介入治疗问题,结合自己的研究和临床应用经验,进行系统介绍和讨论,以飨读者。

1	胃肠道肿瘤的X线诊断.....	1402
2	胃肠道肿瘤CT诊断.....	1404
3	胃肠道肿瘤MRI诊断.....	1406
4	胃肠道肿瘤超声诊断.....	1408
5	胃肠道肿瘤核素诊断.....	1410
6	胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗.....	1413

## 胃肠道肿瘤的X线诊断

尚克中, 程英升, 吴春根

尚克中, 程英升, 吴春根, 上海交通大学附属第六人民医院放射科  
上海市 200233  
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

尚克中, 程英升, 吴春根. 胃肠道肿瘤的X线诊断. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1402-1404

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1402.asp>

### 0 引言

胃肠道肿瘤的X线诊断主要包括透视、平片、造影等成像技术。造影又分单对比、双对比造影。双对比造影(double contrast radiography, DC)经过多年的不断改进和完善,已发展成为现代双对比造影。由于现代双对比造影对胃肠道病变的诊断具有方便、快捷、准确等优点,多年来得到广泛应用,并一直作为胃肠道肿瘤诊断的基本方法之一。

### 1 面临挑战中的双对比造影新进展

近20a来,以现代DC为代表的钡剂造影或钡检(barium radiography, barium examination)作为显示胃肠道器官病变的基本诊断手段,经历了迅速提高、蓬勃发展、几乎没有竞争对手的鼎盛时期之后,近10a来已逐渐转入到面临主要来自内镜和其他影像手段的挑战和竞争,逐渐丧失优势的危机时期。

面对严峻的挑战,许多专家承认钡检确实存在不少严重问题,指出钡检“如不改进,有被淘汰的可能”,并不断努力,在许多方面取得了令人瞩目的新进展<sup>[1-20]</sup>。

1.1 价值和表现 DC的表现及其与病变病理改变的对照研究<sup>[21-23]</sup>,近年仍常有新发现,其中较有价值者有: (1)胃窦幽门肥大皱襞的意义。1999年Arora et al<sup>[24]</sup>在1796例胃DC片中选出有胃-幽门肥大皱襞者进行分析:肥大皱襞呈黏膜下平整块状者37(92%)例,证实其非为肿瘤,认为此表现不需再作内镜及活检。另有报道认为CT检查发现胃窦有粗大皱襞时应再作DC检查而不必做内镜; (2)胃和十二指肠粗大息肉状或结节状皱襞与炎症和幽门螺杆菌有密切关系; (3)7例胃非息肉性腺瘤中的4例表现为边缘凹陷,瘤体平坦或脐状凹陷,在双对比



影像和大体病理上均与 II c 型早癌难以区别; 结肠增生性小息肉亦可有此表现; (4) 呈分散灶状的胃小区增大为肠腺化生的表现; (5) 城垛样隆起可能为子宫内膜移位至肠道的特征性表现; (6) 用经口插管 DC 查出的 99 例胃早癌或微小进展癌中在内镜下却“有时难以肯定”, 可说明 DC 精查的重要价值。

1.2 技术欠缺与影像认知问题 钡检技术的欠缺致病变不能显示或虽已显示但因疏忽或不熟悉未能认知而导致漏误诊者很常见, 据我国 315 个单位调查, DC 技术有欠缺者占 29 %, 因未能认知 DC 病变影像而发生漏误诊者 33 %<sup>[14]</sup>。

1.3 幽门螺杆菌 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp) 于 1980 年代初被发现并逐渐证实其与胃炎、消化溃疡、胃癌、胃淋巴瘤等病有密切关系, 对 Hp 的诊断和治疗已形成了一次胃肠病学的“革命”, 迄今仍处于“Hp 时代”<sup>[24, 25]</sup>。Hp 可浸润胃和十二指肠黏膜, 发生水肿和炎性反应。Levine et al<sup>[26]</sup>发现 Hp 胃炎患者的 DC 像中, 47 % 有胃或十二指肠球部皱襞粗大或呈颗粒状, 但有此表现而无 Hp 者亦占 22 %, 无特异性。胃小区增大达 3 mm 以上的 88 例中 16 % 有 Hp, 对照组大于此值者仅 3 例。有作者认为 DC 见胃或十二指肠有粗大皱襞经呼气尿素试验或血清试验呈 Hp 阳性者可给予抗 Hp 的三联药物治疗而不必再行内镜检查。

1.4 非内镜的 DC 导向活检 钳取活体组织作组织学的定性诊断是内镜的主要优势之一。但亦有内镜活检后难以作出诊断需等待一段时间后作钡检的情况<sup>[2]</sup>。不经内镜, 在 DC 定位引导下经鼻胃管作胃与十二指肠的活检现已有成熟的经验和满意的效果<sup>[2]</sup>。Bender et al<sup>[25]</sup>报告的 DC 引导下 126 例胃和十二指肠活检的结果, 证实为 Hp 胃炎者 49 %, 非 Hp 胃炎者 29 %, 阴性者 29 %, 30 % 活检阳性而双对比无异常表现; 与同期进行的内镜活检结果比较, DC 活检的敏感性和特异性分别为 94 % 和 100 %。DC 导引活检由放射科医师操作, 方便易行, 2-3 min 内即可完成, 无并发症, 费用低廉, 与内镜活检费用之比为 1 : 2.6。

1.5 数字荧光成像 用数字荧光成像(digital fluoroscopic imaging, DFI)机摄取和处理钡检影像是胃肠放射学发展的方向<sup>[26]</sup>。与普通 X 线机比较, 数字机的主要优点有: (1) 曝光时间短, 器官蠕动影响小; (2) 射线剂量低(较普通钡检少 50-80 %); (3) 不需换片、洗片等手续, 节省人力和时间; (4) 可对影像作后处理; 有些密度差别很小的病变(如肠气囊肿)只有在后处理时才能发现<sup>[27]</sup>; (5) 影像的保存和传输极为方便, 是实现“无片放射科”和 PACS 的主要组成部分。

数字机屏幕的像素数为 1 024 × 1 024 (现已有 2 000 × 2 000 者), 低于胶片影像的分辨率, 因 DC 影像不需要很高的分辨率并需在较短时间内完成检查, 用数字机是最适合的选择。虽然也有认为数字机胃肠造影的影像有时较差而持反对态度的意见, 其主要原因大概是

未掌握数字机的性能和技术欠缺以及未做好影像的后处理所致。

## 2 小肠

小肠是内镜的盲区, 而钡检可完全显示。经口插管小肠造影(enteroclysis)被认为是诊断的金标准<sup>[28]</sup>。报告此法检查的 184 例中的 15 % 发现病变而用其他各种影像检查和内镜未能查出。近年小肠钡检的新进展有: (1) 提高口服钡剂小肠造影效果和检查便捷性的研究, 重新观察了钡剂通过小肠抵达盲肠的正常时间(平均 86 min); (2) 促动力药应用效果的研究; (3) 不经插管口服钡剂和产气剂行小肠 DC 方法的研究; (4) 经肛气囊阻塞行回肠 DC 的研究, 可显示鹅口疮样的微小病变; (5) 检查方法的改进使小肠病变的检出率显著增加, 例如发生于小肠的子宫内膜异位症在一篇文章中报道 5 例; (6) 用 CT 检查小肠皱襞有一定价值。

## 3 结肠

由于结肠内镜检查操作难度大、穿孔机会多, 且有约 15 % 的例次不能抵达近段结肠, 所以钡剂灌肠造影在结肠病变诊断中的重要地位在较长时期内不会改变。在美国, 结肠灌肠造影已被列入结肠癌普查方法和医保范围; 导致结肠钡灌肠数量持续下降的主要原因是该普查方法也包括直肠镜和乙状结肠镜检查, 因其应用方便并可进行息肉切除治疗。钡灌前的肠道准备和规范的检查技术对病变的检出十分重要, 为此, Rubesin et al<sup>[29]</sup>不久前又发表了专文, 呼吁必须重视结肠钡灌 DC 技术。

## 4 辅助药物

低张药与促动力药是钡检常用的 2 种药物。报道表明: (1) 低张药物在双对比造影中仍被许多单位常规应用; (2) 比较了不同品种的此类药物(如 glucagon, hyoscine)给予的适宜时间与效果的关系; (3) 不同药物对不同器官低张效果的差异(对十二指肠的效果较对胃者差, 剂量应加倍; hyoscine 的作用效果与 glucagon 无明显差别); (4) 发现将 glucagon 滴入鼻腔所达到的低张效果与同剂量肌肉注射者的效果相同, 发现了一种可能是更为方便的给药途径; (5) 报道认为促动力药如胃复安(metoclopramide)可使口服钡剂在较短时间内通过小肠和大部分结肠, 检出其比较明显、突出的病变, 钡检前 5-10 min 服药较适合。

## 5 新造影剂

符合 DC 要求的优质钡剂的成功开发是 1970 年代 DC 得以提高和普及的首要条件和基础。但当今的钡剂仍有不少不足之处, 主要是密度过高、黏附力较差和经胃肠道壁破损处漏溢后的严重危害性。据报道, 一种新型的不含钡碘水造影剂已研制成功, 性能优于钡剂而无上述钡剂的缺点, 临床前实验获得满意结果<sup>[30]</sup>。

## 6 动力疾病

胃肠动力疾病的发病数日渐增多。在咽部吞咽障碍和吸入等异常情况的检查方面动态造影有不可替代的重要作用<sup>[9-11]</sup>。动力疾病的造影检查已成为胃肠放射学主要发展方向之一。近年的研究将咽和食管动态造影或排粪造影检查与公认为是“金标准”的测压法密切结合或同步对照,对其相关器官的功能性和结构性异常的发现有重要价值<sup>[12]</sup>。据统计,美国临床各科上胃肠道钡检申请单中吞咽障碍、消化不良等以动力病变主要症状为拟诊而要求观察胃肠动力情况者占40%以上。

总之,我国的胃肠道放射学和钡检面临的挑战形势可能较国外更为严峻,在未来发展中我国放射学家应予更多的关注。

## 7 参考文献

- Ott DJ, Gelfand DW. The future of barium radiology. *Br J Radiol* 1997;70:S171-S176
- Goldberg HI, Margulis AR. Gastrointestinal radiology in the United States: An overview of the past 50 years. *Radiology* 2000;216:1-7
- 程英升, 尚克中. 中国胃肠影像学发展的50年. *世界华人消化杂志* 2000;8:1225-1232
- 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科技文献出版社, 1995:3-41
- 程英升, 尚克中. 中华放射学杂志 46 a 胃肠影像学论著回顾性分析与思考. *中华放射学杂志* 2001;35:725-730
- 尚克中, 齐雨根. 胃肠道钡剂造影数量下降的趋势与对策. *中华放射学杂志* 1997;31:857-858
- 李松年. 胃肠道肿瘤影像学诊断的进展. *新消化病学杂志* 1997;5(特刊6):14
- Shang KZ. Evolution of gastrointestinal double contrast radiography in China: researches, application and popularization. *World J Gastroenterol* 1998;4:197-201
- 尚克中. 胃肠双对比造影硫酸钡制剂的性能要求与应用趋势. *中华放射学杂志* 1996;30:795-797
- 郭俊渊. 现代腹部影像诊断学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2001:123-157
- 尚克中. 中华影像医学消化系统分册. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:1-50
- 尚克中, 程英升, 吴春根, 庄奇新. 吞咽障碍患者咽和食管的动态造影. *世界华人消化杂志* 1999;7:52-54
- 尚克中. 关注食管动力病变的造影检查. *中华放射学杂志* 2000;34:642-644
- 尚克中, 高玉洁, 程英升, 李松年. 我国胃肠双对比造影的现状与应关注的问题. *中华放射学杂志* 2001;35:872-875
- 廖翠薇, 易习之, 初铭忠. 乙状结肠扭转的腹部平片分析. *新消化病学杂志* 1996;4:505-506
- 李民主, 陈海堂, 张正威. 小型X线机行胃双重造影检查的价值. *新消化病学杂志* 1995;3:217-219
- 张国维. 上消化道早期癌的X线诊断. *新消化病学杂志* 1993;1:171-173
- 张国维. 提高上消化道癌肿的早期诊断. *新消化病学杂志* 1995;3:65-66
- 孙鸿年, 孙启东. 中医中药在消化系X线诊断上的应用. *消化病学杂志* 1993;1:169-170
- 赵洪川, 王诗雅, 赵恭华, 颜珏, 吴铁镛. 食管裂孔疝X线诊断20例. *新消化病学杂志* 1997;5:232
- Shindoh N, Nakagawa T, Ozaki Y, Kyogoku S, Sumi Y, Katayama H. Overlooked gastric carcinoma: pitfalls in upper gastrointestinal radiology. *Radiology* 2000;217:409-414
- Kim SH, Han JK, Yoon CJ, Park SJ, Kim TK, Song CS, Choi BI. Gastric adenoma with atypical appearance: findings on double-contrast barium study with histopathologic correlation. *Abdom Imaging* 2000;25:24-28
- Yoo CC, Levine MS, Furth EE, Salhany KE, Rubesin SE, Laufer I, Herlinger H. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: radiographic findings in six patients. *Radiology* 1998;208:239-243
- Arora R, Levine MS, Harvey RT, Laufer I, Rubesin SE. Hyperplastic antral-pyloric fold: reassessment of radiographic findings in 40 patients. *Radiology* 1999;213:347-351
- Bender GN, Mullins DJ, Makuch RS. The need for using fluoroscopic guidance to obtain gastric biopsies when in search of *Helicobacter pylori* with a nonendoscopic method. *Eur J Radiol* 1999;32:163-170
- Levine MS, Laufer I. The gastrointestinal tract: dos and don'ts of digital imaging. *Radiology* 1998;207:311-316
- Saitoh H, Okuno Y, Suzuki M, Takasu K, Kim YC, Mukaihara S, Kataoka M, Hayakawa K, Nishimura K. Various manifestations of early and minimally advanced gastric cancer in gastrointestinal series (GIS). *Radiat Med* 1997;15:259-265
- Nolan DJ, Traill ZC. The current role of the barium examination of the small intestine. *Clin Radiol* 1997;52:809-820
- Rubesin SE, Levine MS, Laufer I, Herlinger H. Double-contrast barium enema examination technique. *Radiology* 2000;215:642-650
- Estep KG, Josef KA, Bacon ER, Illig CR, Toner JL, Mishra D, Blazak WF, Miller DM, Johnson DK, Allen JM, Spencer A, Wilson SA. 1, 3, 5-Trialkyl-2, 4, 6-triiodobenzenes: novel X-ray contrast agents for gastrointestinal imaging. *J Med Chem* 2000;43:1940-1948

## 胃肠道肿瘤CT诊断

吴春根, 程英升, 尚克中

吴春根, 程英升, 尚克中, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233

项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net

电话: 021-64368920 传真: 021-64701361

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

吴春根, 程英升, 尚克中. 胃肠道肿瘤CT诊断. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1404-1406

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1404.asp>

## 0 引言

胃肠道肿瘤一向以钡剂检查和内镜及内镜下活检为主要手段,但在CT出现约20年间,CT技术发展日新月异,新的成像方法不断涌现,随着CT新技术在临床的推广应用,CT在胃肠道肿瘤诊断中的作用日显突出。

1969年Housefield发明了CT以来,许多研究者不断尝试用CT诊断胃肠道肿瘤,但早期则常规CT扫描速度慢和图像分辨率低,常规CT一直作为钡餐和内镜的补充检查手段<sup>[1-3]</sup>。1989年,单层螺旋CT(SCT)的出现,开创了CT容积扫描的先河,显著的扩大了CT在胃肠道肿瘤检查方面的应用范围<sup>[4,5]</sup>。1998年多层螺旋CT(MSCT)的开发成功,标志着CT历史的又一次重大革新,显著地提高了CT图像的纵向分辨率,扫描速度明显加快,比单层螺旋CT的扫描速度提高约4-8倍。CT的两维和三维成像技术日趋标准化,多平面成像

## 6 动力疾病

胃肠动力疾病的发病数日渐增多。在咽部吞咽障碍和吸入等异常情况的检查方面动态造影有不可替代的重要作用<sup>[9-11]</sup>。动力疾病的造影检查已成为胃肠放射学主要发展方向之一。近年的研究将咽和食管动态造影或排粪造影检查与公认为是“金标准”的测压法密切结合或同步对照,对其相关器官的功能性和结构性异常的发现有重要价值<sup>[12]</sup>。据统计,美国临床各科上胃肠道钡检申请单中吞咽障碍、消化不良等以动力病变主要症状为拟诊而要求观察胃肠动力情况者占40%以上。

总之,我国的胃肠道放射学和钡检面临的挑战形势可能较国外更为严峻,在未来发展中我国放射学家应予更多的关注。

## 7 参考文献

- Ott DJ, Gelfand DW. The future of barium radiology. *Br J Radiol* 1997;70:S171-S176
- Goldberg HI, Margulis AR. Gastrointestinal radiology in the United States: An overview of the past 50 years. *Radiology* 2000;216:1-7
- 程英升, 尚克中. 中国胃肠影像学发展的50 a. *世界华人消化杂志* 2000;8:1225-1232
- 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科技文献出版社, 1995:3-41
- 程英升, 尚克中. 中华放射学杂志 46 a 胃肠影像学论著回顾性分析与思考. *中华放射学杂志* 2001;35:725-730
- 尚克中, 齐雨根. 胃肠道钡剂造影数量下降的趋势与对策. *中华放射学杂志* 1997;31:857-858
- 李松年. 胃肠道肿瘤影像学诊断的进展. *新消化病学杂志* 1997;5(特刊6):14
- Shang KZ. Evolution of gastrointestinal double contrast radiography in China: researches, application and popularization. *World J Gastroenterol* 1998;4:197-201
- 尚克中. 胃肠双对比造影硫酸钡制剂的性能要求与应用趋势. *中华放射学杂志* 1996;30:795-797
- 郭俊渊. 现代腹部影像诊断学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2001:123-157
- 尚克中. 中华影像医学消化系统分册. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:1-50
- 尚克中, 程英升, 吴春根, 庄奇新. 吞咽障碍患者咽和食管的动态造影. *世界华人消化杂志* 1999;7:52-54
- 尚克中. 关注食管动力病变的造影检查. *中华放射学杂志* 2000;34:642-644
- 尚克中, 高玉洁, 程英升, 李松年. 我国胃肠双对比造影的现状与应关注的问题. *中华放射学杂志* 2001;35:872-875
- 廖翠薇, 易习之, 初铭忠. 乙状结肠扭转的腹部平片分析. *新消化病学杂志* 1996;4:505-506
- 李民主, 陈海堂, 张正威. 小型X线机行胃双重造影检查的价值. *新消化病学杂志* 1995;3:217-219
- 张国维. 上消化道早期癌的X线诊断. *新消化病学杂志* 1993;1:171-173
- 张国维. 提高上消化道癌肿的早期诊断. *新消化病学杂志* 1995;3:65-66
- 孙鸿年, 孙启东. 中医中药在消化系X线诊断上的应用. *消化病学杂志* 1993;1:169-170
- 赵洪川, 王诗雅, 赵恭华, 颜珏, 吴铁镛. 食管裂孔疝X线诊断20例. *新消化病学杂志* 1997;5:232
- Shindoh N, Nakagawa T, Ozaki Y, Kyogoku S, Sumi Y, Katayama H. Overlooked gastric carcinoma: pitfalls in upper gastrointestinal radiology. *Radiology* 2000;217:409-414
- Kim SH, Han JK, Yoon CJ, Park SJ, Kim TK, Song CS, Choi BI. Gastric adenoma with atypical appearance: findings on double-contrast barium study with histopathologic correlation. *Abdom Imaging* 2000;25:24-28
- Yoo CC, Levine MS, Furth EE, Salhany KE, Rubesin SE, Laufer I, Herlinger H. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: radiographic findings in six patients. *Radiology* 1998;208:239-243
- Arora R, Levine MS, Harvey RT, Laufer I, Rubesin SE. Hyperplastic antral-pyloric fold: reassessment of radiographic findings in 40 patients. *Radiology* 1999;213:347-351
- Bender GN, Mullins DJ, Makuch RS. The need for using fluoroscopic guidance to obtain gastric biopsies when in search of *Helicobacter pylori* with a nonendoscopic method. *Eur J Radiol* 1999;32:163-170
- Levine MS, Laufer I. The gastrointestinal tract: dos and don'ts of digital imaging. *Radiology* 1998;207:311-316
- Saitoh H, Okuno Y, Suzuki M, Takasu K, Kim YC, Mukaihara S, Kataoka M, Hayakawa K, Nishimura K. Various manifestations of early and minimally advanced gastric cancer in gastrointestinal series (GIS). *Radiat Med* 1997;15:259-265
- Nolan DJ, Traill ZC. The current role of the barium examination of the small intestine. *Clin Radiol* 1997;52:809-820
- Rubesin SE, Levine MS, Laufer I, Herlinger H. Double-contrast barium enema examination technique. *Radiology* 2000;215:642-650
- Estep KG, Josef KA, Bacon ER, Illig CR, Toner JL, Mishra D, Blazak WF, Miller DM, Johnson DK, Allen JM, Spencer A, Wilson SA. 1, 3, 5-Trialkyl-2, 4, 6-triiodobenzenes: novel X-ray contrast agents for gastrointestinal imaging. *J Med Chem* 2000;43:1940-1948

## 胃肠道肿瘤CT诊断

吴春根, 程英升, 尚克中

吴春根, 程英升, 尚克中, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233

项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net

电话: 021-64368920 传真: 021-64701361

收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

吴春根, 程英升, 尚克中. 胃肠道肿瘤CT诊断. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1404-1406

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1404.asp>

## 0 引言

胃肠道肿瘤一向以钡剂检查和内镜及内镜下活检为主要手段,但在CT出现约20 a内,CT技术发展日新月异,新的成像方法不断涌现,随着CT新技术在临床的推广应用,CT在胃肠道肿瘤诊断中的作用日显突出。

1969年Housefield发明了CT以来,许多研究者不断尝试用CT诊断胃肠道肿瘤,但早期则常规CT扫描速度慢和图像分辨率低,常规CT一直作为钡餐和内镜的补充检查手段<sup>[1-3]</sup>。1989年,单层螺旋CT(SCT)的出现,开创了CT容积扫描的先河,显著的扩大了CT在胃肠道肿瘤检查方面的应用范围<sup>[4,5]</sup>。1998年多层螺旋CT(MSCT)的开发成功,标志了CT历史的又一次重大革新,显著地提高了CT图像的纵向分辨率,扫描速度明显加快,比单层螺旋CT的扫描速度提高约4-8倍。CT的两维和三维成像技术日趋标准化,多平面成像

(multiplanar reformation, MPR)、曲面重组法 (curved planar reformation, CPR)、最大密度投影(maximum intensity projection, MIP)、最小密度投影(minimum intensity projection, MinIP)、表面覆盖法成像(shaded surface display, SSD)、容积积分技术(volume-rendering technique, VRT)和CT血管造影术(CTA)正逐步向临床推广, CT仿真内镜(CTVE)和CT胃或结肠成像(CTG, CTC)不断地挑战传统的内镜和胃肠钡剂检查<sup>[6-10]</sup>, 近年开发成功的容积显示技术(VR)具有四维显影的效果, 不断地开拓医生的视野. 在胃肠道肿瘤检查方面, 现代螺旋CT检查所得到的信息是传统钡剂检查和内镜检查无法比拟的.

## 1 胃肠道肿瘤螺旋CT检查技术<sup>[1-4, 6]</sup>

1.1 技术参数<sup>[3, 6]</sup> 通常采用螺旋扫描模式, 取得的容积资料用于后期的各种二维或三维图像重建. 单层螺旋CT准直器宽度1-5 mm, 螺距为1-1.5 mm; 多层螺旋CT准直器宽度为4 × 1 mm或4 × 3 mm, 螺距为4-6 mm. 标准横断面图像有效层厚8-10 mm, 二维或三维重建图像层厚为一层准直器宽度的50%.

1.2 患者准备和造影剂的选用 胃肠道准备同钡剂检查, 并做碘过敏试验. 为了抑制胃肠道的蠕动, 在没有禁忌证前提下, 通常在检查前选用低张药物, 静脉注射0.1 mg胰高血糖素或肌注20 mg山莨菪碱; 若观察肿瘤的血供和邻近血管, 须在检查时静脉团注90-120 mL非离子型碘剂, 注射速率3-5 mL/s. 胃肠道CT检查通常须在检查前引入造影剂以显示腔内和管壁. 造影剂一般分阳性造影剂和阴性造影剂两种: (1)阳性造影剂: 10-20 g/L硫酸钡混悬液或20-30 mL/L水溶性碘剂, 主要用于胃和小肠的检查. (2)阴性造影剂: 主要包括水、脂肪乳剂、空气和二氧化碳, 一般用于胃、十二指肠和结肠检查.

1.3 口服法螺旋CT胃肠道造影 口服法螺旋CT胃肠道造影主要用于小肠造影. 在扫描前45 min开始, 连续口服阳性造影剂800-1 000 mL, 扫描前15 min再服500 mL后, 进行一次屏气全腹部(包括盆腔)螺旋扫描. 范围包括上起膈顶下至耻骨联合上缘, 同时静脉注射含碘造影剂, 延迟时间70 s扫描, 以层厚50%重建后传输至工作站作后处理. 用MPR联合CPR进行编辑加工, 作轴面、冠状面、矢状面成像, 此法可显示全部小肠, 诊断小肠异常如肠梗阻、肿瘤等, 尤其对部分性小肠梗阻, 结合横断面成像可显示肿瘤的特征, 提高小肠肿瘤诊断的准确率和定性能力.

1.4 胃肠道螺旋CT三维重建 不用口服造影剂, 仰卧位, 全腹部一次扫描完成, 以50%重建图像后在工作站作后处理, 获取轴面、冠状面、矢状面影像. 用MPR联合CPR跟踪, 沿着感兴趣区用软组织演算, 取得所需的多层重建影像. 此法可提供肠壁厚度, 肠腔内外肿块轮廓、范围的影像, 也可在增强扫描后, 进行后处理重建, 进一步显示肿瘤特征.

1.5 胃肠道空气铸型螺旋CT成像 首先需对胃肠道进行充气, 以气体作为对比剂, 应用螺旋CT的VRT后处理技术可获得类似双对比造影的胃肠道空气铸型三维图像. 由于三维CT可对胃肠道管腔进行任意角度综合观察, 从而可以较好地显示胃肠道大体结构、又可显示腔外肿块, 所以优于双对比造影. 此法对小肠梗阻患者或高龄体弱不能耐受其他检查者尤其适用, 肠腔内气体是诊断的依据, 显示梗阻的原因和范围.

## 2 胃肠道肿瘤的定位和定性诊断<sup>[1-3]</sup>

通过CT的多平面成像可较准确地判断肿瘤位于腔内、壁内或壁外. 除了囊肿、脂肪瘤、畸胎瘤有一定的特征性外, 其他肿瘤的组织学特征较难判断, 通常可通过观察肿瘤的形态及生长方式判断肿瘤的良恶性. 恶性肿瘤的主要CT表现有: (1)胃肠管壁局限或广泛增厚, 向腔内、外形成不规则形肿块; (2)肿块可累及邻近的脏器和血管; (3)局部或远处淋巴结肿大; (3)肝脏多发转移灶; (4)腹水形成. 良性肿瘤的CT表现主要有: (1)肿块多膨胀性生长, 呈圆形或椭圆形; (2)邻近脏器多为推压改变; (3)无淋巴结肿大和腹水. 对于小于10 mm的肿瘤, 定性诊断正确率较低, 而对较大肿瘤或进展期肿瘤的定性正确率达85%.

## 3 胃肠道恶性肿瘤的CT分期和治疗后随访

胃肠道恶性肿瘤的CT分期一直是近10 a来的研究热点之一. 各家的研究结果存在一定差异. 采用动态增强扫描可显示70%胃肠壁的三层结构, 但对判断T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>期较表浅肿瘤的正确率较低, 仅为38%; 对T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>期肿瘤的判断正确率较高, 可达78%<sup>[8]</sup>. 对邻近或远处淋巴结转移判断敏感性62%, 特异性达96%<sup>[2]</sup>. 对远处实质性脏器转移判断的敏感性达80%, 特异性达95%. 周康荣 et al<sup>[2]</sup>研究了一组66例胃癌病例, 经手术和病理的严格对照, CT分期的准确率为86%, 术前切除性评估准确率达92%.

CT可作为胃肠道恶性肿瘤术后随访检查方法. 一组70例胃癌术后转移和复发研究<sup>[2]</sup>表明, 只有约11%病例表现胃局部复发, 而高达89%的病例表现为邻近淋巴结、肝脏和腹膜的转移. 故此, 周康荣 et al<sup>[2]</sup>提倡应将CT和钡剂及内镜一样列为常规的随访方法, 这样三种方法相互弥补, 以提高胃肠道恶性肿瘤术后转移和复发的检出率.

## 4 胃肠道肿瘤CT仿真内镜成像

1994年Vining<sup>[5]</sup>首先报道了CT仿真内镜技术(CTVE). CTVE具有较高的敏感性、特异性、安全性和耐受性, 扩大了CT在胃肠道肿瘤检查中的应用范围. CTVE对直径大于10 mm的息肉的敏感性及其特异性分别为75%和91%, 直径介于6-9 mm的敏感性和特异性分别为66%和82%, 直径小于5 mm分别为45%和80%. Vining

和 Hara et al<sup>[6]</sup>的两组独自的研究中,所有结肠癌(4/20, 3/70)均被检出。CTVE 的原始容积数据通过最小密度投影法或透明法转换<sup>[10-14]</sup>,可以重建出类似胃肠道钡剂造影图像,该图像可三维旋转,任意角度观察病变。同时可交互重建二维多平面图像,获得不同层厚的胃肠道横断面、冠状面和矢状面图像。

总之,胃肠道螺旋 CT 检查是一种非创伤性检查技术,患者的耐受性好,同时具有较高的敏感性、特异性和安全性。随着多层螺旋 CT 技术不断突破和图像后处理软件的完善,在胃肠道肿瘤诊断方面,CT 有望成为与钡剂和内镜等检查方法同等重要的检查技术。

## 5 参考文献

- 1 尚克中,陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995:382-385
- 2 周康荣. 腹部 CT. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 131-155
- 3 Gore RM, Leving MS. Textbook of gastrointestinal radiology. 2nd ed. Pennsylvania: W.B. Saunders company, 2000:77-85
- 4 卢延. 胃肠道肿瘤影像诊断技术进展和评价. 中国医学计算机成像杂志 2001;7:130-133
- 5 Vining DJ. Virtual colonoscopy. *Semin Ultrasound CTMR* 1999; 20:56-60
- 6 Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ehman RL, Ilstrup DM. Colorectal polyp detection with CT colography: two- versus three-dimensional techniques. Work in progress. *Radiology* 1996;200:49-54
- 7 Ogata I, Komohara Y, Yamashita Y, Mitsuzaki K, Takahashi M, Ogawa M. CT evaluation of gastric lesions with three-dimensional display and interactive virtual endoscopy: comparison with conventional barium study and endoscopy. *Am J Roentgenol* 1999;172:1263-1270
- 8 Lee DH, Ko YT. Advanced gastric carcinoma: the role of three-dimensional and axial imaging by spiral CT. *Abdom Imaging* 1999;24:111-116
- 9 Rossi M, Broglio L, Graziano P, Maccioni F, Bezzi M, Masciangelo R, Rossi P. Local invasion of gastric cancer: CT findings and pathologic correlation using 5-mm incremental scanning, hypotonia, and water filling. *Am J Roentgenol* 1999;172:383-388
- 10 Wood BJ, O'Malley ME, Hahn PF, Mueller PR. Virtual endoscopy of the gastrointestinal system outside the colon. *Roentgenol* 1998;171:1367-1372
- 11 Fenlon HM, Clarke PD, Ferrucci JT. Virtual colonoscopy: imaging features with colonoscopic correlation. *Am J Roentgenol* 1998;170:1303-1309
- 12 Federle MP. Focused appendix CT technique: a commentary. *Radiology* 1997;202:20-21
- 13 张晓鹏,徐刚,徐舟,孙应实. 胃肠道螺旋 CT 三维成像方法及临床应用评价. 中华放射学杂志 2000;34:308-312
- 14 许达生,李子平,孟俊非. CT 仿真胃结肠内窥镜技术及其临床应用. 中国医学计算机成像杂志 1999;5:265-268

## 胃肠道肿瘤 MRI 诊断

吴春根,程英升,尚克中

吴春根,程英升,尚克中,上海交通大学附属第六人民医院放射科  
上海市 200233  
项目负责人:程英升,200233,上海市宜山路600号,上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话:021-64368920 传真:021-64701361  
收稿日期:2003-03-08 接受日期:2003-03-29

吴春根,程英升,尚克中. 胃肠道肿瘤 MRI 诊断. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1406-1408

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1406.asp>

## 0 引言

磁共振成像(MRI)是利用磁场中人体氢质子共振后产生的信号成像的方法,不同的脉冲序列可产生不同参数成像。在人体可任意层面成像,图像具有优秀的组织分辨率和空间分辨率,已成为中枢神经系统和肌骨组织最重要的检查方法之一。早期的磁共振机器扫描速度慢,成像序列少,胃肠道 MRI 检查主要限于食管和直肠的检查,随着 MRI 技术发展,如快速扫描、脂肪抑制技术和胃肠造影剂完善, MRI 在胃肠道的应用已日趋广泛<sup>[1-3]</sup>。

## 1 胃肠道肿瘤 MRI 检查及新技术<sup>[4-10]</sup>

### 1.1 线圈的选择

1.1.1 表面线圈 主要用于小范围胃肠道的成像,图像信噪比高。主要分体外表面线圈和腔内表面线圈。近年开发成功的相控阵线圈是由多个表面线圈组合而成,不仅图像分辨率高,同时可较大范围成像,主要用于腹部和盆腔节段性胃肠道检查。腔内表面线圈的分辨率更高,分辨率达 300  $\mu\text{m}$ ,目前应用较多是直肠表面线圈和胃腔表面线圈,可清楚显示肿瘤局部侵犯的范围,用于术前肿瘤 T 分期的评价。

1.1.2 体线圈 主要用于更大范围胃肠道成像,如胸部的食管、腹部和盆腔的胃肠道。主要用于肿瘤的检出,同时可显示其他脏器,可用于肿瘤淋巴结和肝脏等脏器转移的分期评估。

### 1.2 造影剂的使用

1.2.1 血管造影剂 采用经静脉注射方式,主要用于显示正常血管、肿瘤血管和肿瘤实质血供性质。目前临床应用最广泛的是钆剂,如 Gd-DTPA。

1.2.2 胃肠道造影剂 采用口服或插管方式将造影剂引入胃肠道,可将胃肠道充盈,利用造影剂与软组织间的信号差,对比显示胃肠道管壁和管腔。根据造影剂的信号强度不同,分为阳性造影剂和阴性造影剂。阳性造影剂包括氯化锰, Mn-DPDP、Gd-DTPA 和柠檬酸铵等。多用于 T<sub>2</sub>WI, 如 MRGI, MR 小肠灌肠和 MR 结肠造影检查。阴性造影剂包括 PROB、黏土混合物、空气、硫酸钡混悬液,超顺磁性微粒。在 T<sub>1</sub>WI 和 T<sub>2</sub>WI 都有阴性造影效果。水在 T<sub>1</sub>WI 具有阴性造影剂特性。

1.3 脉冲序列 胃肠道具有蠕动特性,静态和实时成像需要较快的成像速度。MRI 机器性能一般要求高场强(大于 1.0 Tesla)和快速梯度场。常用的成像序列有常规自旋回波序列(SE),快速自旋回波序列(FSE),抗相梯度回波序列(SGPR 或 SGE),辅以脂肪抑制技术和呼吸补偿技术。

1.4 胃肠道 MR 水成像 由于肠道在发生梗阻时产生大量肠腔积液,肠液在 MR 重 T<sub>2</sub> 序列呈高信号,成为天然的造影剂,此为 MR 水成像技术诊断基础。扫描平面包括轴面、冠状面、矢状面,扫描程序主要采用 FSE 和快速 MR 影像 HASTE 序列,可以显示肠壁增厚和梗阻性肿块。



和 Hara et al<sup>[6]</sup>的两组独自的研究中,所有结肠癌(4/20, 3/70)均被检出。CTVE 的原始容积数据通过最小密度投影法或透明法转换<sup>[10-14]</sup>,可以重建出类似胃肠道钡剂造影图像,该图像可三维旋转,任意角度观察病变。同时可交互重建二维多平面图像,获得不同层厚的胃肠道横断面、冠状面和矢状面图像。

总之,胃肠道螺旋 CT 检查是一种非创伤性检查技术,患者的耐受性好,同时具有较高的敏感性、特异性和安全性。随着多层螺旋 CT 技术不断突破和图像后处理软件的完善,在胃肠道肿瘤诊断方面,CT 有望成为与钡剂和内镜等检查方法同等重要的检查技术。

## 5 参考文献

- 1 尚克中,陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995:382-385
- 2 周康荣. 腹部 CT. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 131-155
- 3 Gore RM, Leving MS. Textbook of gastrointestinal radiology. 2nd ed. Pennsylvania: W.B. Saunders company, 2000:77-85
- 4 卢延. 胃肠道肿瘤影像诊断技术进展和评价. 中国医学计算机成像杂志 2001;7:130-133
- 5 Vining DJ. Virtual colonoscopy. *Semin Ultrasound CTMR* 1999; 20:56-60
- 6 Hara AK, Johnson CD, Reed JE, Ehman RL, Ilstrup DM. Colorectal polyp detection with CT colography: two- versus three-dimensional techniques. Work in progress. *Radiology* 1996;200:49-54
- 7 Ogata I, Komohara Y, Yamashita Y, Mitsuzaki K, Takahashi M, Ogawa M. CT evaluation of gastric lesions with three-dimensional display and interactive virtual endoscopy: comparison with conventional barium study and endoscopy. *Am J Roentgenol* 1999;172:1263-1270
- 8 Lee DH, Ko YT. Advanced gastric carcinoma: the role of three-dimensional and axial imaging by spiral CT. *Abdom Imaging* 1999;24:111-116
- 9 Rossi M, Broglio L, Graziano P, Maccioni F, Bezzi M, Masciangelo R, Rossi P. Local invasion of gastric cancer: CT findings and pathologic correlation using 5-mm incremental scanning, hypotonia, and water filling. *Am J Roentgenol* 1999;172:383-388
- 10 Wood BJ, O'Malley ME, Hahn PF, Mueller PR. Virtual endoscopy of the gastrointestinal system outside the colon. *Roentgenol* 1998;171:1367-1372
- 11 Fenlon HM, Clarke PD, Ferrucci JT. Virtual colonoscopy: imaging features with colonoscopic correlation. *Am J Roentgenol* 1998;170:1303-1309
- 12 Federle MP. Focused appendix CT technique: a commentary. *Radiology* 1997;202:20-21
- 13 张晓鹏,徐刚,徐舟,孙应实. 胃肠道螺旋 CT 三维成像方法及临床应用评价. 中华放射学杂志 2000;34:308-312
- 14 许达生,李子平,孟俊非. CT 仿真胃结肠内窥镜技术及其临床应用. 中国医学计算机成像杂志 1999;5:265-268

## 胃肠道肿瘤 MRI 诊断

吴春根,程英升,尚克中

吴春根,程英升,尚克中,上海交通大学附属第六人民医院放射科  
上海市 200233  
项目负责人:程英升,200233,上海市宜山路600号,上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话:021-64368920 传真:021-64701361  
收稿日期:2003-03-08 接受日期:2003-03-29

吴春根,程英升,尚克中. 胃肠道肿瘤 MRI 诊断. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1406-1408  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1406.asp>

## 0 引言

磁共振成像(MRI)是利用磁场中人体氢质子共振后产生的信号成像的方法,不同的脉冲序列可产生不同参数成像。在人体可任意层面成像,图像具有优秀的组织分辨率和空间分辨率,已成为中枢神经系统和肌骨组织最重要的检查方法之一。早期的磁共振机器扫描速度慢,成像序列少,胃肠道 MRI 检查主要限于食管和直肠的检查,随着 MRI 技术发展,如快速扫描、脂肪抑制技术和胃肠造影剂完善, MRI 在胃肠道的应用已日趋广泛<sup>[1-3]</sup>。

## 1 胃肠道肿瘤 MRI 检查及新技术<sup>[4-10]</sup>

### 1.1 线圈的选择

1.1.1 表面线圈 主要用于小范围胃肠道的成像,图像信噪比高。主要分体外表面线圈和腔内表面线圈。近年开发成功的相控阵线圈是由多个表面线圈组合而成,不仅图像分辨率高,同时可较大范围成像,主要用于腹部和盆腔节段性胃肠道检查。腔内表面线圈的分辨率更高,分辨率达 300  $\mu\text{m}$ ,目前应用较多是直肠表面线圈和胃腔表面线圈,可清楚显示肿瘤局部侵犯的范围,用于术前肿瘤 T 分期的评价。

1.1.2 体线圈 主要用于更大范围胃肠道成像,如胸部的食管、腹部和盆腔的胃肠道。主要用于肿瘤的检出,同时可显示其他脏器,可用于肿瘤淋巴结和肝脏等脏器转移的分期评估。

### 1.2 造影剂的使用

1.2.1 血管造影剂 采用经静脉注射方式,主要用于显示正常血管、肿瘤血管和肿瘤实质血供性质。目前临床应用最广泛的是钆剂,如 Gd-DTPA。

1.2.2 胃肠道造影剂 采用口服或插管方式将造影剂引入胃肠道,可将胃肠道充盈,利用造影剂与软组织间的信号差,对比显示胃肠道管壁和管腔。根据造影剂的信号强度不同,分为阳性造影剂和阴性造影剂。阳性造影剂包括氯化锰, Mn-DPDP、Gd-DTPA 和柠檬酸铵等。多用于 T<sub>2</sub>WI, 如 MRGI, MR 小肠灌肠和 MR 结肠造影检查。阴性造影剂包括 PROB、黏土混合物、空气、硫酸钡混悬液,超顺磁性微粒。在 T<sub>1</sub>WI 和 T<sub>2</sub>WI 都有阴性造影效果。水在 T<sub>1</sub>WI 具有阴性造影剂特性。

1.3 脉冲序列 胃肠道具有蠕动特性,静态和实时成像需要较快的成像速度。MRI 机器性能一般要求高场强(大于 1.0 Tesla)和快速梯度场。常用的成像序列有常规自旋回波序列(SE),快速自旋回波序列(FSE),抗相梯度回波序列(SFGR 或 SGE),辅以脂肪抑制技术和呼吸补偿技术。

1.4 胃肠道 MR 水成像 由于肠道在发生梗阻时产生大量肠腔积液,肠液在 MR 重 T<sub>2</sub> 序列呈高信号,成为天然的造影剂,此为 MR 水成像技术诊断基础。扫描平面包括轴面、冠状面、矢状面,扫描程序主要采用 FSE 和快速 MR 影像 HASTE 序列,可以显示肠壁增厚和梗阻性肿块。

1.5 MR 结肠造影(MR colonography, MRC) MRC 是指从直肠灌入 2 000 mL 含量为 0.5 mol/L 顺磁性造影剂 40 mL 的溶液后采用一次屏气  $T_1W$  扫描, 获得高分辨率 3D 影像和重  $T_2W$  2D 单次激发自旋回波影像。该法主要用于结肠息肉的诊断。

1.6 MR 仿真内镜技术(MR virtual endoscopy, MRVE) MRVE 是利用 MR 扫描的资料中原始图像, 在工作站用特殊的软件进行三维表面重建, 选择正确的管腔阈值先产生其内镜图像, 从而可以直视观察空腔脏器内表面的立体图像, 类似解剖标本的黏膜皱襞, 如内镜所见。MRVE 主要用于胃和结肠研究, 结肠应用较多。对隆起性和狭窄性病变诊断准确性高, 其主要缺陷是组织特异性差、不能进行活检、对平坦性病变敏感性差。故对胃肠道肿瘤的整体诊断能力仍低于双对比造影和内镜。

## 2 食管肿瘤 MRI

MRI 一般作为钡餐、内镜和 CT 以外的备选检查方法, 多用于食管癌的分期检查。食管癌可切除性的评价研究表明, MRI 和 CT 正确性相仿, 分别为 84 % 和 87 %<sup>[11]</sup>。显示肿瘤侵犯椎骨和脊髓 MRI 优于 CT。MR 无须注射造影剂即可鉴别邻近肿大淋巴结和血管。食管囊肿在  $T_2WI$  呈高信号, 没有强化是 MR 特征性表现; 食管平滑肌瘤在  $T_2WI$  倾向于等信号, 而食管癌在  $T_2WI$  呈明显高信号。

## 3 胃、十二指肠肿瘤 MRI

MRI 对小于 1.0 cm 肿瘤检出率较低, 对进展期肿瘤检出率高达 95-98 %<sup>[12]</sup>。胃癌表现胃壁不规则增厚, 在  $T_1WI$  呈低信号, 在  $T_2WI$  呈中等高信号。MRI 对胃癌的 T 分期准确性为 44-88 %; MRI 对淋巴结转移的敏感性 41 %, 特异性为 94 %。十二指肠肿瘤在 MRI 表现为腔内肿块, 同时可判断肿块对胰腺有无侵犯, MR 胰胆管造影(MRCP)可显示十二指肠肿瘤对胆管及胰管侵犯程度。

## 4 小肠肿瘤 MRI

MRI 主要应用于小肠肿瘤检出和定位<sup>[13-16]</sup>。平滑肌瘤多为类圆形和椭圆形肿块,  $T_1WI$  为低信号,  $T_2WI$  呈中等高信号, 较大的肿瘤常伴坏死, 坏死腔一般与肠腔相通为其特点。脂肪瘤多位于回盲瓣,  $T_1$  和  $T_2$  均为高信号使特征表现。腺癌和腺瘤恶变多表现为不规则形肿块, 伴邻近肠壁增厚和肠腔狭窄。MR 小肠造影可实时显示造影剂在通过, 可明确肿瘤引起肠腔狭窄或梗阻部位。

## 5 大肠肿瘤 MRI

直肠和乙状结肠因其位置较为固定, MRI 的应用最广泛<sup>[17, 18]</sup>。首先在肿瘤分期方面应用最多, 体线圈检查分期正确性为 76 %, 外部表面线圈分期正确性为 89 %, 腔内表面线圈分期正确性更高, 达 92 %。其次主要用于直肠癌术后随访检查, 因手术瘢痕和肿瘤复发灶信

号不同可正确地判断肿瘤有无复发。

MR 仿真内镜(MRVE)可以产生结肠的三维图像<sup>[19, 20]</sup>, 显示肠腔内的息肉和结肠癌, 同时可参考辅助多平面成像, 定位诊断正确性几乎达 100 %。MRVE 比 CTVE 图像空间分辨率低, 但没有电离辐射损伤, MRVE 检查时无痛苦, 耐受性明显高于结肠镜。

## 6 胃肠道肿瘤的 MRS 分析

磁共振波谱分析(MRS)可反映肿瘤细胞生化、代谢信息, 用于评估肿瘤细胞的活性。如  $^{31}P$  化合物包括 ATP、PCr 和 Pi 的峰值测定可反映细胞磷代谢信息。MRS 有望成为胃肠道恶性肿瘤化疗和放疗后疗效监测方法<sup>[21]</sup>。

总之, 随着 MRI 机器普及和 MRI 技术的发展, MRI 在胃肠道肿瘤诊断方面将发挥越来越大的作用。

## 7 参考文献

- 1 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第 1 版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995:417-420
- 2 周康荣, 陈祖望. 体部磁共振成像. 第 1 版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000:993-1015
- 3 Gore RM, Leving MS. Textbook of gastrointestinal radiology. 2nd ed. Pennsylvania:W.B.Saunders Company, 2000:86-97
- 4 卢延. 胃肠道肿瘤影像诊断技术进展和评价. 中国医学计算机成像杂志 2001;7:130-133
- 5 Gilderdale DJ, deSouza NM, Coutts GA, Chui MK, Larkman DJ, Williams AD, Young IR. Design and use of internal receiver coils for magnetic resonance imaging. *British J Radiol* 1999;72:1141-1151
- 6 Rinck PA, Smevik O, Nilsen G, Klepp O, Onsrud M, Oksendal A, Borseth A. Oral magnetic particles in MR imaging of the abdomen and pelvis. *Radiology* 1995;178:775-779
- 7 Brown JJ. Gastrointestinal contrast agents for MR imaging. *Magn Reson Imaging Clin North Am* 1996;4:25-39
- 8 Regan F, Cavaluzzi J, Nguyen B. Fast MR abdominal imaging using the HASTE sequence. *Am J Roentgenol* 1998;170:1471-1476
- 9 Zagoria RJ, Wolfman NT. Magnetic resonance imaging of colorectal cancer. *Semin Roentgenol* 1996;31:162-173
- 10 Paley MR, Ros PR. MRI of the gastrointestinal tract. *European Radiol* 1997; 7:1387-13971
- 11 Buenaventura P, Luketich JD. Surgical staging of esophageal cancer. *Chest Surg Clin N Am* 2000;10:487-497
- 12 Dux M, Roeren T, Kuntz C, Schipp A, Scheller D, Mechttersheimer G, Kauffmann GW. MRI for staging of gastric carcinoma: first results of an experimental prospective study. *J Comput Assist Tomogr* 1997;21:66-72
- 13 Debatin JF, Patak MA. MRI of the small and large bowel. *Eur Radiol* 1999;9:1523-1534
- 14 Minowa O, Ozaki Y, Kyogoku S, Shindoh N, Sumi Y, Katayama H. MR imaging of the small bowel using water as a contrast agent in a preliminary study with healthy volunteers. *Am J Roentgenol* 1999;173:581-582
- 15 Umschaden HW, Szolar D, Gasser J, Umschaden M, Haselbach H. Small-Bowel Disease: Comparison of MR enteroclysis images with conventional enteroclysis and surgical findings. *Radiology* 2000;215:717-725
- 16 Hilfiker PR, Zimmermann-Paul GG, Schmidt M, Klotz HP, Kael GM, Debatin JF. Intestinal and peritoneal bleeding: detection with an intravascular contrast agent and fast three-dimensional MR imaging-preliminary experience from an experimental study. *Radiology* 1999;209:769-774
- 17 Keogan MT, Edelman RR. Technologic advances in abdominal MR imaging. *Radiology* 2001;220:310-320
- 18 Thoeni RF. Colorectal cancer: cross-sectional imaging for staging of primary tumor and detection of local recurrence. *Am J*

- Roentgenol* 1991;156:909-915
- 19 Luboldt W, Debatin JF. Virtual endoscopic colonography based on 3D MRI. *Abdom Imaging* 1998;23:568-572
- 20 Schoenenberger AW, Bauerfeind P, Krestin GP, Debatin JF. Virtual colonoscopy with magnetic resonance imaging: *in vitro* evaluation of a new concept. *Gastroenterology* 1997;112:1863-1870
- 21 Pilatus U, Aboagye E, Artemov D, Mori N, Ackerstaff E, Bhujwalla ZM. Real-time measurements of cellular oxygen consumption, pH, and energy metabolism using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 2001;45:749-755

## 胃肠道肿瘤超声诊断

胡兵, 周进祝

胡兵, 周进祝, 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科 上海市 200233  
项目负责人: 胡兵, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科. binghu@online.sh.cn  
电话: 021-64369181-8751 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

胡兵, 周进祝. 胃肠道肿瘤超声诊断. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1408-1410  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1408.asp>

### 0 引言

近年来随着超声诊断仪性能的改进和胃肠道肿瘤超声诊断经验的不断积累及方法学的不断完善<sup>[1,2]</sup>, 超声探测在此类疾病诊断中的价值日益提高。

### 1 食管癌的超声诊断

1.1 经体表超声诊断食管癌 探头频率取2.5-10 MHz, 食管上段及近贲门部的食管下段肿瘤较易显示, 该法能弥补X线检查不足。除了能提供肿瘤内部结构, 浸润深度及与周围组织关系和有无淋巴结转移外, 还能通过观察颈段食管的充气状况, 间接反映中下段及贲门有无狭窄及癌肿。更能清楚显示经食管超声、X线钡餐造影、内镜检查较易漏诊的食管入口处肿瘤<sup>[3,4]</sup>。

1.2 经食管超声(TUS)诊断食管癌 经食管超声(TUS)直接式扫查可根据固有肌层回声带完整与否区别早期与中晚期食管癌<sup>[5]</sup>。还可根据肿瘤是否贯穿整个食管壁、外膜光带是否完整来判断癌组织浸润肌层及外膜的程度。并可将食管癌周邻脏器的受累程度分成不同粘连等级, 为手术方案的制定提供客观依据。因此经食管超声不失为术前估测手术难度的一种简便、易行方法<sup>[6-9]</sup>。

1.3 经超声内镜(EUS)诊断食管癌 通常经超声内镜(EUS)探查可将食管组织显示为五层结构: 第一层(强回声)为食管表层黏液及鳞状上皮; 第二层(低回声)为黏膜层(m); 第三层(强回声)为黏膜下层(sm); 第四层(低回声)为固有肌层(pm); 第五层(强回声)为纤维膜<sup>[10-12]</sup>。固有肌层又可分为内环肌和外环肌, 二者之间为中等回声的肌间组织。吞水时食管壁蠕动、管腔扩大、肌层变薄过程清晰可见<sup>[10]</sup>。

食管癌表现为管壁局部的正常层次结构紊乱, 黏

膜层模糊不清, 管壁多明显增厚、膨隆、边缘不规则, 内部欠均匀的低回声实质性肿块。食管癌有无淋巴结转移关系到患者的预后。淋巴结的大小、形态、内部回声可用来观察有无癌组织转移, 特别是淋巴结的回声类型对判断有无转移更为重要。内部回声欠均匀, 与癌肿的回声一致或呈圆形之低回声区, 应强烈提示有转移。依据肿瘤的浸润深度, 对周邻组织结构的侵犯和淋巴结肿大情况, EUS对食管癌能作出较正确的TNM分期。肿瘤位于第1、2、3层回声带内相当于TNM系统的I期癌(T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>); 累及第4层相当于II期癌, 如伴有局部淋巴结转移为II B期(T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>), 不伴淋巴结转移为II A期(T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>); 第5层回声带中断, 肿瘤对周邻组织结构有侵犯征象并有局部淋巴结转移者相当于TNM分期的III期癌(T<sub>3-4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>); 有远处转移灶时为IV期癌(T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1</sub>)。食管癌分期对患者的处理有很大的帮助, 如已有远处转移(IV期), 则无必要再作根治术, 可作姑息性手术或作放疗<sup>[10]</sup>。

### 2 胃癌的超声诊断

2.1 胃癌的超声造影检查 由于生理状态下胃腔内积气, 不能形成良好的反射界面以及受到超声诊断仪分辨率的限制, 经腹壁超声检查基本被经腹壁超声造影检查所取代。实践证明经腹壁超声造影检查诊断胃癌的方法有较大的优点, 由于应用造影剂排除了胃腔内积气及黏液对声波传播的干扰, 使之在声像图上清楚地显示出胃腔的形态、胃壁的断层结构, 从而得以测量胃壁的厚度、辨认胃壁层次结构, 同时提高了胃后方结构及胰腺的显示能力。能清楚显示肿瘤病变的部位、形态及大小, 而且更能显示病变浸润的深度及对脏器的侵犯, 有无淋巴结转移的情况, 从而为临床正确诊断、合理治疗与预后估计提供了重要的依据<sup>[11]</sup>。胃超声造影检查, 方法简便、无论是采用无回声型的“胃快速显像液”, 还是有回声型的胃窗-85造影剂均对人体无任何创伤与副作用, 受检者易于接受、老幼皆宜。为临床解决了一大批年老体弱、或因病不能接受胃镜检查、或因乙肝抗原阳性及有其他消化道传染病不宜接受胃镜检查以及不愿意接受胃镜检查的患者就诊需要。造影剂检查显示的胃壁层次的组织学结构: 第一层强回声为界面反射及黏膜表层, 第二层低回声为黏膜层(m), 第三层强回声为黏膜下层(sm), 第四层低回声为固有肌层(pm), 第五层强回声为浆膜(s)、浆膜下组织及界面反射<sup>[12]</sup>。

2.2 胃癌的超声内镜诊断 EUS是将超声探头在内镜直视下到达靶器官进行近距离探查, 目前已成为胃癌诊断的重要影像学技术。由于避免了气体的干扰, 腹壁脂肪的衰减及具有探测频率较高的特点, 其声像图表现甚为清晰, 组织层次尤为分明, 除同胃超声造影描述的特征外, 有的甚至可探测出黏膜肌层及固有层内之纵肌, 总共可达9-11层组织结构<sup>[12]</sup>。EUS对胃癌侵犯深度的判断、TNM分期诊断优势甚为明显, 特别是其

- Roentgenol* 1991;156:909-915
- 19 Luboldt W, Debatin JF. Virtual endoscopic colonography based on 3D MRI. *Abdom Imaging* 1998;23:568-572
- 20 Schoenenberger AW, Bauerfeind P, Krestin GP, Debatin JF. Virtual colonoscopy with magnetic resonance imaging: *in vitro* evaluation of a new concept. *Gastroenterology* 1997;112:1863-1870
- 21 Pilatus U, Aboagye E, Artemov D, Mori N, Ackerstaff E, Bhujwalla ZM. Real-time measurements of cellular oxygen consumption, pH, and energy metabolism using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 2001;45:749-755

## 胃肠道肿瘤超声诊断

胡兵, 周进祝

胡兵, 周进祝, 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科 上海市 200233  
项目负责人: 胡兵, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院超声医学科. binghu@online.sh.cn  
电话: 021-64369181-8751 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

胡兵, 周进祝. 胃肠道肿瘤超声诊断. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1408-1410  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1408.asp>

### 0 引言

近年来随着超声诊断仪性能的改进和胃肠道肿瘤超声诊断经验的不断积累及方法学的不断完善<sup>[1,2]</sup>, 超声探测在此类疾病诊断中的价值日益提高。

### 1 食管癌的超声诊断

1.1 经体表超声诊断食管癌 探头频率取 2.5-10 MHz, 食管上段及近贲门部的食管下段肿瘤较易显示, 该法能弥补 X 线检查不足. 除了能提供肿瘤内部结构, 浸润深度及与周围组织关系和有无淋巴结转移外, 还能通过观察颈段食管的充气状况, 间接反映中下段及贲门有无狭窄及癌肿. 更能清楚显示经食管超声、X 线钡餐造影、内镜检查较易漏诊的食管入口处肿瘤<sup>[3,4]</sup>.

1.2 经食管超声(TUS)诊断食管癌 经食管超声(TUS)直接式扫查可根据固有肌层回声带完整与否区别早期与中晚期食管癌<sup>[5]</sup>. 还可根据肿瘤是否贯穿整个食管壁、外膜光带是否完整来判断癌组织浸润肌层及外膜的程度. 并可将食管癌周邻脏器的受累程度分成不同粘连等级, 为手术方案的制定提供客观依据. 因此经食管超声不失为术前估测手术难度的一种简便、易行方法<sup>[6-9]</sup>.

1.3 经超声内镜(EUS)诊断食管癌 通常经超声内镜(EUS)探查可将食管组织显示为五层结构: 第一层(强回声)为食管表层黏液及鳞状上皮; 第二层(低回声)为黏膜层(m); 第三层(强回声)为黏膜下层(sm); 第四层(低回声)为固有肌层(pm); 第五层(强回声)为纤维膜<sup>[10-12]</sup>. 固有肌层又可分为内环肌和外环肌, 二者之间为中等回声的肌间组织. 吞水时食管壁蠕动、管腔扩大、肌层变薄过程清晰可见<sup>[10]</sup>.

食管癌表现为管壁局部的正常层次结构紊乱, 黏

膜层模糊不清, 管壁多明显增厚、膨隆、边缘不规则, 内部欠均匀的低回声实质性肿块. 食管癌有无淋巴结转移关系到患者的预后. 淋巴结的大小、形态、内部回声可用来观察有无癌组织转移, 特别是淋巴结的回声类型对判断有无转移更为重要. 内部回声欠均匀, 与癌肿的回声一致或呈圆形之低回声区, 应强烈提示有转移. 依据肿瘤的浸润深度, 对周邻组织结构的侵犯和淋巴结肿大情况, EUS 对食管癌能作出较正确的 TNM 分期. 肿瘤位于第 1、2、3 层回声带内相当于 TNM 系统的 I 期癌(T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>); 累及第 4 层相当于 II 期癌, 如伴有局部淋巴结转移为 II B 期(T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>), 不伴淋巴结转移为 II A 期(T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>); 第 5 层回声带中断, 肿瘤对周邻组织结构有侵犯征象并有局部淋巴结转移者相当于 TNM 分期的 III 期癌(T<sub>3-4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>0</sub>); 有远处转移灶时为 IV 期癌(T<sub>4</sub>N<sub>1</sub>M<sub>1</sub>). 食管癌分期对患者的处理有很大的帮助, 如已有远处转移(IV 期), 则无必要再作根治术, 可作姑息性手术或作放疗<sup>[10]</sup>.

### 2 胃癌的超声诊断

2.1 胃癌的超声造影检查 由于生理状态下胃腔内积气, 不能形成良好的反射界面以及受到超声诊断仪分辨率的限制, 经腹壁超声检查基本被经腹壁超声造影检查所取代. 实践证明经腹壁超声造影检查诊断胃癌的方法有较大的优点, 由于应用造影剂排除了胃腔内积气及黏液对声波传播的干扰, 使之在声像图上清楚地显示出胃腔的形态、胃壁的断层结构, 从而得以测量胃壁的厚度、辨认胃壁层次结构, 同时提高了胃后方结构及胰腺的显示能力. 能清楚显示肿瘤病变的部位、形态及大小, 而且更能显示病变浸润的深度及对脏器的侵犯, 有否淋巴结转移的情况, 从而为临床正确诊断、合理治疗与预后估计提供了重要的依据<sup>[11]</sup>. 胃超声造影检查, 方法简便、无论是采用无回声型的“胃快速显像液”, 还是有回声型的胃窗-85 造影剂均对人体无任何创伤与副作用, 受检者易于接受、老幼皆宜. 为临床解决了一大批年老体弱、或因病不能接受胃镜检查、或因乙肝抗原阳性及有其他消化道传染病不宜接受胃镜检查以及不愿意接受胃镜检查的患者就诊需要. 造影剂检查显示的胃壁层次的组织学结构: 第一层强回声为界面反射及黏膜表层, 第二层低回声为黏膜层(m), 第三层强回声为黏膜下层(sm), 第四层低回声为固有肌层(pm), 第五层强回声为浆膜(s)、浆膜下组织及界面反射<sup>[12]</sup>.

2.2 胃癌的超声内镜诊断 EUS 是将超声探头在内镜直视下到达靶器官进行近距离探查, 目前已成为胃癌诊断的重要影像学技术. 由于避免了气体的干扰, 腹壁脂肪的衰减及具有探测频率较高的特点, 其声像图表现甚为清晰, 组织层次尤为分明, 除同胃超声造影描述的特征外, 有的甚至可探测出黏膜肌层及固有层内之纵肌, 总共可达 9-11 层组织结构<sup>[12]</sup>. EUS 对胃癌侵犯深度的判断、TNM 分期诊断优势甚为明显, 特别是其

具有活组织检查的功能,可取得病理学依据,大大确立了其在胃癌的诊断、分期、选择治疗方案、肿瘤随访、预后判断方面的临床价值<sup>[13-15]</sup>。另有作者提出,对直径小于2 cm的黏膜内癌,可用经超声内镜黏膜剥离切除术或激光照射法进行治疗<sup>[16]</sup>。

胃癌可分为:黏膜层癌(m癌)、黏膜下层癌(sm癌)、固有肌层癌(pm癌)、浆膜层癌(s癌)。早期胃癌(m癌和sm癌)的EUS声像图特点:黏膜层和黏膜下层隆起或凹陷,层次结构紊乱,黏膜下层呈虫蚀或缩窄图像<sup>[17]</sup>。早期胃癌的确诊要依靠胃镜活检。进展期胃癌(pm癌和s癌)EUS声像图特点<sup>[5]</sup>: (1)固有肌层癌(pm癌),第三层中断,第五层光滑; (2)浆膜层癌(s癌),第五层不规则、断裂,与周围组织分界不清。

2.3 彩色多普勒血流显像在胃癌诊断中的应用价值 高分辨率、低速多普勒血流显像(CDFI)技术的发展为临床提供了一种动态观察肿瘤内部及外周血管分布及血流状态的先进手段,使肿瘤血管定量分析成为可能<sup>[18, 19]</sup>。孙英 et al<sup>[20]</sup>通过对一组67例胃癌和胃溃疡患者病灶内血流状况的探查,对此作了报道。该文作者对胃癌或胃溃疡病灶行CDFI检查,设定仪器的彩色增益、壁滤波、血流速度量程等参数条件并保持一致。根据病灶内血流信号的多少,以血流信号最丰富的切面为准把其丰富程度分为四个等级:0级-病灶内未见血流信号; I级-为少量血流,可见1-2个点状或细棒状血管; II级-为中量血流,可见3-4个点状血管或一个较长的血管; III级-为多量血流,可见5个以上点状血管或2个较长的血管。结果提示,胃癌内血流信号检出率(89.7%)明显高于胃溃疡(25%,  $P < 0.01$ )。胃癌的血流信号丰富程度分级多为II-III级,胃溃疡病灶内血流信号多为0-I级,二者差异显著( $P < 0.01$ )。B超与CDFI显示的血流信号相结合,则胃癌诊断的敏感性、特异性和诊断率分别是94.8%、89.3%、92.5%。CDFI在胃癌和胃溃疡的鉴别诊断中具有一定的实用价值,而且方法简便,可以作为胃癌鉴别诊断的辅助检查手段<sup>[21]</sup>。

2.4 超声内镜声像图的纹理分析对胃黏膜下肿瘤的诊断价值 超声内镜声像图的纹理分析是近年发展起来的用于图像处理的一门新技术,系观察组织定征的方法之一,其最终目的是对图像特征作定性或定量的结论。目前广泛应用的超声成像仪所产生的主要是组织形态学上的成像,只解决了病变组织的形态、位置,而病理学上的特征不清楚。组织定征则试图了解组织的病理、生理状况与组织声学参数之间的关系,为解决EUS对病灶诊断的定量指标。金震东 et al<sup>[22]</sup>根据一组29例经EUS诊断,病理确诊为胃黏膜下肿瘤患者的资料,选择平均灰度、对比度、方差、斜度、峭度、五项纹理参数作为胃黏膜下肿瘤超声内镜声像图的特征量加以分析。结果提示:这些纹理参数值的变化与胃黏膜下肿瘤的声像图特征具有很大的相关性,对胃黏膜下平滑肌瘤与平滑肌肉瘤的性质鉴别有一定价值。

2.5 胃癌超声内镜分期与其细胞增生力学的关系 胃癌超声内镜术前分期与术后病理结果高度一致性的结论已有相当多的报道,并在临床逐渐推广应用。郭文 et al<sup>[23]</sup>通过超声内镜术前检查分期研究胃癌影像学改变与肿瘤细胞增生力学之间的关系,通过对一组73例胃癌患者进行TNM分期并取内镜活组织作核仁形成区嗜银蛋白银染计数、增生细胞核抗原免疫组化及流式细胞仪-DNA检测,作相关分析。认为T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>期或有淋巴结转移时,这些指标较T<sub>1</sub>期或无淋巴结转移时有不同程度增高。提示: (1)随着胃癌浸润转移进展,其黏膜存在明显不同的增生力学的异常,而术前EUS分期与这种增生力学的改变有较好的相关性; (2)以EUS术前分期为依据,对术前活检标本的检测可以反映胃癌病变细胞生物学行为改变的真实性和准确性,有助于临床术前对胃癌患者预后的正确评估。

2.6 胃癌超声内镜分期与微小卫星DNA不稳定性(MIN)关系的研究 郭文 et al<sup>[24]</sup>根据同一组患者超声内镜术前的资料,同时采用银染PCR-SSCP方法检测内镜活组织第2、5、17号染色体4个位点的MIN。结果MIN总检出率为37%。T<sub>1</sub>至T<sub>4</sub>期癌MIN检出率分别为40.4%、33.3%、39.3%、35.7% ( $P > 0.05$ ),提示与胃癌的浸润深度无关。有淋巴结转移组为51.4%,无淋巴结转移组22.2% ( $P < 0.025$ )。认为MIN的出现与癌变及恶性转移有一定的关系,MIN是胃癌病变中常见的分子遗传学事件<sup>[25]</sup>。

2.7 三维超声对胃癌的诊断价值 三维超声解剖图像逼真、真实感强,对肿瘤的浸润、转移及对周邻关系的分辨更加容易,有助于改善肿瘤的分级准确性<sup>[26]</sup>。

### 3 结、直肠肿瘤的超声诊断

由于结肠腔充满内容物及气体,不断蠕动,多重反射加上腹壁脂肪的声衰减使得经腹壁超声探测诊断肠道肿瘤,尤其是早期肿瘤甚为困难。目前EUS在直肠肿瘤的诊断、分期、随访中发挥越来越大的作用,被认为是直肠癌局部分期的最准确的影像学诊断技术之一,也被推荐作为姑息性局部切除术患者的首选检查方法<sup>[27-33]</sup>。

## 4 参考文献

- 1 Catalano MF. Endoscopic therapy of complications following laparoscopic cholecystectomy: how much can we expect? *Endoscopy* 1997;29:389-391
- 2 Kawasaki T, Ueo T, Itani T, Shibatohe M, Mimura J, Komori H, Todo A, Kudo M. Vascularity of advanced gastric carcinoma: evaluation by using power Doppler imaging. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:149-153
- 3 杨扬,李慧玲,苏福彬,曹海根. 经食管超声估价食管癌手术可行性探讨. *中国医学影像技术* 1999;15:768
- 4 许国铭. 超声内镜在胃肠道肿瘤中的应用. *临床外科杂志* 1999;7:42
- 5 毕素株,张鲁文. 超声在胃癌诊断及分期中的应用. *新消化病杂志* 1996;4:703
- 6 胡兵,周永昌,闻晖,储榆德,许蕙敏,陈曾德,朱汉民,陈伟,朱佩英,叶蓓莉. 非血管内导管超声的临床初步应用. *中国超声医学杂志* 1998;14(增刊):15-19



- 7 徐书真, 崔里峪, 匡继红, 杨玉玲, 张小军. 贲门癌的B超诊断价值. 中国医学影像技术 1998;14:588
- 8 周兴祥, 吕斌, 殷军, 吴鹏, 盛明洪, 陈景兰, 胡方兰. 消化道复合声学造影诊断小肠疾病的价值. 世界华人消化杂志 1999;7: 180-181
- 9 Messmann H, Schlottmann K. Role of endoscopy in the staging of esophageal and gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 2001; 20:78-81
- 10 Richards DG, Brown TH, Manson JM. Endoscopic ultrasound in the staging of tumours of the oesophagus and gastro-oesophageal junction. *Ann R Coll Surg Engl* 2000;82:311-317
- 11 朱邦杰, 朗东方, 金雅兰, 宋淑华, 赵晓辛, 杨曦晨, 赵云洁. 胃癌影像检查方法的选择(附96例分析). 中国医学影像技术 1996;12:294
- 12 周永昌, 郭万学. 超声医学. 第3版. 北京: 科学技术文献出版社, 1998:926-931
- 13 鲁宏, 龚水根, 陈留斌. 胃肠道肿瘤的影像学诊断进展. 中国医学影像技术 1999;15:822
- 14 Kelly S, Harris KM, Berry E, Hutton J, Roderick P, Cullingworth J, Gathercole L, Smith MA. A systematic review of the staging performance of endoscopic ultrasound in gastro-oesophageal carcinoma. *Gut* 2001;49:534-539
- 15 Bergman JJ, Fockens P. Endoscopic ultrasonography in patients with gastro-esophageal cancer. *Eur J Ultrasound* 1999; 10:127-138
- 16 Izumi Y, Inoue H, Kawano T, Tani M, Tada M, Okabe S, Takeshita K, Endo M. Endosonography during endoscopic mucosal resection to enhance its safety: a new technique. *Surg Endosc* 1999;13:358-360
- 17 刘有玉, 俞丽仙, 沈国钧. 胃癌的超声内镜诊断和鉴别诊断. 中国医学影像技术 1998;14:862
- 18 Ishida H, Konno K, Hamashima Y, Naganuma H, Komatsuda T, Ishida J, Sato M, Ohya Y, Masamune O. Sonographic and color Doppler findings of gastrointestinal myogenic tumors with a marked extraluminal growth. *Abdom Imaging* 1998;23:496-501
- 19 姚刚, 黄光海, 庄磊. 声学造影剂在肿瘤诊断中的应用价值和前景展望. 中国医学影像技术 1999;15:308
- 20 孙英, 黄勇, 范宜东, 唐永军, 周胜玉, 侯仁刚. 彩色多普勒血流显像在胃癌诊断中的应用价值. 中国医学影像技术 1999;15:625
- 21 Tous F, Busto M. Assessment of abdominal sonography in the diagnosis of tumors of gastroduodenal tract. *J Clin Ultrasound* 1997;25:243
- 22 金震东, 许国铭, 李平, 邹多武, 周康源. 胃黏膜下肿瘤超声内镜声像图的纹理分析价值. 中国医学影像技术 1998;14:483-485
- 23 郭文, 张亚历, 吴保平, 张立力, 孙勇, 周殿元. 胃癌病变术前内镜超声检查分期与其细胞增生力学的关系. 中华消化内镜杂志 1998;15:204
- 24 郭文, 张亚历, 邱红明, 吴保平, 张立力, 周殿元. 胃癌超声内镜分期与微小卫星DNA不稳定性关系的研究. 中国癌症杂志 1999; 9:4-6
- 25 盛剑秋, 晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛检. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 26 Vannier MW, Marsh JL. Three-dimensional imaging, surgical planning and image-guided therapy. *Radiol Clin North Am* 1996;34:545-563
- 27 Hunerbein M, Ghadimi BM, Gretschesl S, Schlag PM. Three-dimensional endoluminal ultrasound: a new method for the evaluation of gastrointestinal tumors. *Abdom Imaging* 1999; 24:445-448
- 28 Ariyama J, Suyama M, Satoh K, Wakabayashi K. Endoscopic ultrasound and intraductal ultrasound in the diagnosis of small pancreatic tumors. *Abdom Imaging* 1998;23:380-386
- 29 牟楠楠. B型超声诊断肠癌的体会. 中国医学影像技术 1996;12: 74
- 30 项明惠, 吴瑛, 郭秋艳. 超声直肠探头在直肠癌诊断中的应用(附12例报告). 中国医学影像技术 1995;11:64
- 31 张万蕾, 李建国, 张颖, 任萍, 刘月洁, 甘丽云. 二维及彩色多普勒超声在结肠癌中的诊断价值. 中国医学影像技术 1999;15:302
- 32 Truong M, Atri M, Bret PM, Reinhold C, Kintzen G, Thibodeau M, Aldis AE, Chang Y. Sonographic appearance of benign and malignant conditions of the colon. *Am J Roentgenol* 1998; 170:1451-1455
- 33 Odegaard S, Nesje LB, Ohm IM, Kimmey MB. Endosonography in gastrointestinal diseases. *Acta Radiol* 1999;40:119-134

## 胃肠道肿瘤核素诊断

陆汉魁

陆汉魁, 上海交通大学附属第六人民医院核医学科 上海市 200233  
项目负责人: 陆汉魁, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院核医学科. luhankui@hotmail.com  
电话: 021-64369181-8753 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

陆汉魁. 胃肠道肿瘤核素诊断. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1410-1413

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1410.asp>

### 0 引言

与常规的医学影像诊断技术(超声、X线CT、及MRI等)不同,核医学显像(或核素显像)需要特定放射性核素标记的显像剂即放射性药物,显像时先将放射性药物引入(通过注射或口服等途径)人体内,再通过显像仪器g相机、单光子计算机断层显像仪(SPECT)或正电子计算机断层显像仪(PET)进行体外平面、全身或断层扫描.核医学显像的实质是显示特定的放射性药物在体内尤其是病灶区域的分布或组织代谢状况,从而明确病灶的性质或某种特性.近年来,随着放射性药物研究及核医学显像仪器的不断发展,核医学显像在临床肿瘤诊断中的应用不断深入,其中也包括对胃肠道肿瘤的诊断.适用于诊断胃肠道肿瘤的放射性药物种类较多,不同的显像剂反映了肿瘤的不同特性,当前最具临床应用价值的是正电子放射性核素 $^{18}\text{F}$ (氟)标记的脱氧葡萄糖( $^{18}\text{FDG}$ ). $^{18}\text{FDG}$  PET显像不仅可以帮助鉴别胃肠道肿瘤的良恶性,而且对胃肠道恶性肿瘤的分期分级、术后瘢痕与复发灶的鉴别诊断及疗效的监测等方面都有较高的临床应用价值.另一些PET肿瘤显像剂正在发展中,其中 $^{18}\text{F}$ 标记5-氟尿嘧啶(5-FU)有望很快应用于临床,指导胃肠道肿瘤的术后化疗.其他核素显像方法如放射性核素标记单克隆抗体进行免疫导向诊断,不仅可以帮助明确胃肠道肿瘤的特性,同时可为免疫导向治疗提供影像诊断学的依据.

### 1 适用于胃肠道肿瘤核素显像的种类

根据所用的放射性核素不同,核素肿瘤显像剂可分为单光子核素放射性药物和正电子放射性药物;而根据显像药物的性质或体内代谢及作用机制的不同,也可将放射性药物划分为:代谢显像、药物显像、免疫显像及受体显像等.表1列出了当前适用于诊断胃肠道肿瘤的放射性药物及尚处于临床前期研究阶段但具有应用前景的放射性药物<sup>[1,2]</sup>.

前些年曾先后有其他多种放射性药物用于胃癌、结肠癌等良恶性鉴别诊断,如: $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PMT、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -植酸钠等.由于这些显像方法在诊断的准确性及其他临床应用价值有限,目前已经较少为临床采用.

- 7 徐书真, 崔里峪, 匡继红, 杨玉玲, 张小军. 贲门癌的B超诊断价值. 中国医学影像技术 1998;14:588
- 8 周兴祥, 吕斌, 殷军, 吴鹏, 盛明洪, 陈景兰, 胡方兰. 消化道复合声学造影诊断小肠疾病的价值. 世界华人消化杂志 1999;7: 180-181
- 9 Messmann H, Schlottmann K. Role of endoscopy in the staging of esophageal and gastric cancer. *Semin Surg Oncol* 2001; 20:78-81
- 10 Richards DG, Brown TH, Manson JM. Endoscopic ultrasound in the staging of tumours of the oesophagus and gastro-oesophageal junction. *Ann R Coll Surg Engl* 2000;82:311-317
- 11 朱邦杰, 朗东方, 金雅兰, 宋淑华, 赵晓辛, 杨曦晨, 赵云洁. 胃癌影像检查方法的选择(附96例分析). 中国医学影像技术 1996;12:294
- 12 周永昌, 郭万学. 超声医学. 第3版. 北京: 科学技术文献出版社, 1998:926-931
- 13 鲁宏, 龚水根, 陈留斌. 胃肠道肿瘤的影像学诊断进展. 中国医学影像技术 1999;15:822
- 14 Kelly S, Harris KM, Berry E, Hutton J, Roderick P, Cullingworth J, Gathercole L, Smith MA. A systematic review of the staging performance of endoscopic ultrasound in gastro-oesophageal carcinoma. *Gut* 2001;49:534-539
- 15 Bergman JJ, Fockens P. Endoscopic ultrasonography in patients with gastro-esophageal cancer. *Eur J Ultrasound* 1999; 10:127-138
- 16 Izumi Y, Inoue H, Kawano T, Tani M, Tada M, Okabe S, Takeshita K, Endo M. Endosonography during endoscopic mucosal resection to enhance its safety: a new technique. *Surg Endosc* 1999;13:358-360
- 17 刘有玉, 俞丽仙, 沈国钧. 胃癌的超声内镜诊断和鉴别诊断. 中国医学影像技术 1998;14:862
- 18 Ishida H, Konno K, Hamashima Y, Naganuma H, Komatsuda T, Ishida J, Sato M, Ohya Y, Masamune O. Sonographic and color Doppler findings of gastrointestinal myogenic tumors with a marked extraluminal growth. *Abdom Imaging* 1998;23:496-501
- 19 姚刚, 黄光海, 庄磊. 声学造影剂在肿瘤诊断中的应用价值和前景展望. 中国医学影像技术 1999;15:308
- 20 孙英, 黄勇, 范宜东, 唐永军, 周胜玉, 侯仁刚. 彩色多普勒血流显像在胃癌诊断中的应用价值. 中国医学影像技术 1999;15:625
- 21 Tous F, Busto M. Assessment of abdominal sonography in the diagnosis of tumors of gastroduodenal tract. *J Clin Ultrasound* 1997;25:243
- 22 金震东, 许国铭, 李平, 邹多武, 周康源. 胃黏膜下肿瘤超声内镜声像图的纹理分析价值. 中国医学影像技术 1998;14:483-485
- 23 郭文, 张亚历, 吴保平, 张立力, 孙勇, 周殿元. 胃癌病变术前内镜超声检查分期与其细胞增生力学的关系. 中华消化内镜杂志 1998;15:204
- 24 郭文, 张亚历, 邱红明, 吴保平, 张立力, 周殿元. 胃癌超声内镜分期与微小卫星DNA不稳定性关系的研究. 中国癌症杂志 1999; 9:4-6
- 25 盛剑秋, 晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛检. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 26 Vannier MW, Marsh JL. Three-dimensional imaging, surgical planning and image-guided therapy. *Radiol Clin North Am* 1996;34:545-563
- 27 Hunerbein M, Ghadimi BM, Gretschesl S, Schlag PM. Three-dimensional endoluminal ultrasound: a new method for the evaluation of gastrointestinal tumors. *Abdom Imaging* 1999; 24:445-448
- 28 Ariyama J, Suyama M, Satoh K, Wakabayashi K. Endoscopic ultrasound and intraductal ultrasound in the diagnosis of small pancreatic tumors. *Abdom Imaging* 1998;23:380-386
- 29 牟楠楠. B型超声诊断肠癌的体会. 中国医学影像技术 1996;12: 74
- 30 项明惠, 吴瑛, 郭秋艳. 超声直肠探头在直肠癌诊断中的应用(附12例报告). 中国医学影像技术 1995;11:64
- 31 张万蕾, 李建国, 张颖, 任萍, 刘月洁, 甘丽云. 二维及彩色多普勒超声在结肠癌中的诊断价值. 中国医学影像技术 1999;15:302
- 32 Truong M, Atri M, Bret PM, Reinhold C, Kintzen G, Thibodeau M, Aldis AE, Chang Y. Sonographic appearance of benign and malignant conditions of the colon. *Am J Roentgenol* 1998; 170:1451-1455
- 33 Odegaard S, Nesje LB, Ohm IM, Kimmey MB. Endosonography in gastrointestinal diseases. *Acta Radiol* 1999;40:119-134

## 胃肠道肿瘤核素诊断

陆汉魁

陆汉魁, 上海交通大学附属第六人民医院核医学科 上海市 200233  
项目负责人: 陆汉魁, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院核医学科. luhankui@hotmail.com  
电话: 021-64369181-8753 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

陆汉魁. 胃肠道肿瘤核素诊断. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1410-1413

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1410.asp>

### 0 引言

与常规的医学影像诊断技术(超声、X线CT、及MRI等)不同,核医学显像(或核素显像)需要特定放射性核素标记的显像剂即放射性药物,显像时先将放射性药物引入(通过注射或口服等途径)人体内,再通过显像仪器g相机、单光子计算机断层显像仪(SPECT)或正电子计算机断层显像仪(PET)进行体外平面、全身或断层扫描.核医学显像的实质是显示特定的放射性药物在体内尤其是病灶区域的分布或组织代谢状况,从而明确病灶的性质或某种特性.近年来,随着放射性药物研究及核医学显像仪器的不断发展,核医学显像在临床肿瘤诊断中的应用不断深入,其中也包括对胃肠道肿瘤的诊断.适用于诊断胃肠道肿瘤的放射性药物种类较多,不同的显像剂反映了肿瘤的不同特性,当前最具临床应用价值的是正电子放射性核素 $^{18}\text{F}$ (氟)标记的脱氧葡萄糖( $^{18}\text{FDG}$ ). $^{18}\text{FDG}$  PET显像不仅可以帮助鉴别胃肠道肿瘤的良恶性,而且对胃肠道恶性肿瘤的分期分级、术后瘢痕与复发灶的鉴别诊断及疗效的监测等方面都有较高的临床应用价值.另一些PET肿瘤显像剂正在发展中,其中 $^{18}\text{F}$ 标记5-氟尿嘧啶(5-FU)有望很快应用于临床,指导胃肠道肿瘤的术后化疗.其他核素显像方法如放射性核素标记单克隆抗体进行免疫导向诊断,不仅可以帮助明确胃肠道肿瘤的特性,同时可为免疫导向治疗提供影像诊断学的依据.

### 1 适用于胃肠道肿瘤核素显像的种类

根据所用的放射性核素不同,核素肿瘤显像剂可分为单光子核素放射性药物和正电子放射性药物;而根据显像药物的性质或体内代谢及作用机制的不同,也可将放射性药物划分为:代谢显像、药物显像、免疫显像及受体显像等.表1列出了当前适用于诊断胃肠道肿瘤的放射性药物及尚处于临床前期研究阶段但具有应用前景的放射性药物<sup>[1,2]</sup>.

前些年曾先后有其他多种放射性药物用于胃癌、结肠癌等良恶性鉴别诊断,如: $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PMT、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -植酸钠等.由于这些显像方法在诊断的准确性及其他临床应用价值有限,目前已经较少为临床采用.

表 1 用于胃肠道肿瘤诊断的放射性药物种类

种类	单光子放射性核素标记	正电子放射性核素标记
代谢显像	$^{99m}\text{Tc}$ -多聚糖*	$^{18}\text{F}$ FDG(氟代脱氧葡萄糖)
	$^{75}\text{Se}$ -蛋氨酸	$^{11}\text{C}$ -MET( $^{11}\text{C}$ 标记蛋氨酸)* $^{18}\text{F}$ ET(氟代酪氨酸)*
免疫显像	( $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99m}\text{Tc}$ )-CEA 单抗	$^{18}\text{F}$ 标记多种单抗 *
	$^{131}\text{I}$ -肝癌单抗Fab片段 <sup>1</sup>	
受体显像	$^{111}\text{In}$ -Octotide	
	$^{99m}\text{Tc}$ (V)DMSA	
药物显像		$^{18}\text{F}$ U(flourouracil)(5-氟尿嘧啶)
其他显像	$^{99m}\text{Tc}$ -DX(大分子右旋糖苷)	

\* 处于临床前期研究阶段但具有应用前景的放射性药物。

## 2 $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像

2.1 近年来在肿瘤的影像学诊断发展中, PET 显像技术引人关注. 大量的临床研究证明:  $^{18}\text{F}$ FDG PET显像对大多数肿瘤(其中也包括胃肠道肿瘤)的诊断价值显著, 临床应用的范围包括: 原发肿瘤的良恶性鉴别、对恶性肿瘤进行分期和分级判断以及对肿瘤的疗效、复发和预后进行评估等.  $^{18}\text{F}$ -FDG PET 显像对多种恶性肿瘤的诊断灵敏度和特异性都高达 90 % 以上<sup>[3-5]</sup>. 在北美和欧洲国家,  $^{18}\text{F}$ FDG-PET 成像被先后批准用于肺癌、淋巴瘤、结肠直肠癌和黑色素瘤等 10 多种恶性肿瘤的临床诊断. 预期在不久的将来, 更多的肿瘤会被批准应用  $^{18}\text{F}$ FDG-PET 显像. 国内也已经建立了多个 PET 中心, 数十家医院和医疗研究机构开展了  $^{18}\text{F}$ FDG-PET 肿瘤显像.

早在 1930 年代, 研究人员就发现恶性肿瘤组织细胞中糖代谢显著增加, 恶性肿瘤细胞糖代谢增加归功于如下因素: 在肿瘤细胞表面葡萄糖转运蛋白分子 GT 表达增加、尤其是转运能力较强的 I 型和 III 型转运分子的表达; 有氧代谢途径的主要酶类如己糖激酶、葡萄糖-6 磷酸酶等的活性下降. 肿瘤细胞的葡萄糖摄取增加、有氧代谢率下降、糖酵解的代谢率比例上升、糖异生及糖原合成受到抑制.  $^{18}\text{F}$ FDG 在体内的分布和代谢过程类似于葡萄糖, 在肿瘤细胞中 FDG 被磷酸激酶磷酸化成为 6-磷酸-FDG, 后者不是糖酵解酶的合适底物, 因此 6-磷酸-FDG 在肿瘤细胞中持续堆积, 当 6-磷酸-FDG 在肿瘤组织中达到一个稳定高水平时, 即可进行 FDG 显像. 可见  $^{18}\text{F}$ FDG 显像的本质是反映了肿瘤组织与肿瘤周围正常组织在糖代谢方面的差异<sup>[6]</sup>.

由于  $^{18}\text{F}$ FDG 显像可广泛应用于临床肿瘤诊断, 近年来针对  $^{18}\text{F}$ FDG 显像的仪器即 PET 成像系统也得以迅速发展, 专用型 PET 仪器使用了 8 层 64 环探测器并进行容积采集, 使全身显像的时间可缩短到 30 min 内. 新的 PET 机型可和多排 X-CT 组合在一起成为 CT/PET, 这样一次成像既可获得 CT 的解剖图像也可获得 PET 代谢图像, 大大方便了肿瘤病灶的定位和定性诊断. 另一方面, 许多双探头 SPECT 系统通过技术改造也可以进行

符合成像, 以适用于较低成本的肿瘤  $^{18}\text{F}$ FDG 显像.

专用型 PET 成像的另一个优点是对病灶进行量化分析, 其中葡萄糖代谢显像的一种半定量的方法标准摄取值(SUV)已经在临床上广泛使用, SUV 是相对于全身平均摄取来说, 在一个给定的感兴趣病灶摄取了多少的表示, 如果  $^{18}\text{F}$ FDG 在整个全身的分布浓度是相同的, SUV 的结果就是 1; SUV 大于 1 表示该区域的摄取增加, 小于 1 表示这个区域的摄取减少, SUV 大于 2.5 常提示病灶为恶性. 2.2  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像在胃肠道肿瘤诊断中的应用<sup>[1-11]</sup>

2.2.1 结肠直肠癌 在胃肠道肿瘤中,  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像最多见用于诊断结肠直肠癌. 但对于结肠直肠癌原发灶的良恶性鉴别诊断,  $^{18}\text{F}$ FDG PET 的临床价值有限. Strauss et al<sup>[1]</sup>的研究结果表明:  $^{18}\text{F}$ FDG PET 在探测结肠直肠癌灶方面比 CT 灵敏, 二者的灵敏度之比为 2 : 1. Gupta et al<sup>[3]</sup>报道, 在 44 例术前组织学证明和 4 例高度怀疑结肠直肠癌患者中, 全身  $^{18}\text{F}$ FDG PET 的诊断灵敏度为 100 %, 而 CT 仅为 37 %, 但 PET 显像的特异性仅为 43 %, CT 则为 83 %.  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像可探测到的最小病灶为 1.5×0.5 cm. 由于正常肠道淋巴组织丰富, 且肠道的淋巴分布存在个体差异, 因此人群的  $^{18}\text{F}$ FDG 摄取及显像图也存在相当大的个体差异, 同时一些良性肠道疾病如炎症病灶(脓肿, 憩室, 寄生虫感染及手术创伤等)均可显著摄取  $^{18}\text{F}$ FDG, 因此  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像结果经常会出现假阳性结果. 虽然假阳性率较高, 但对于临床高度怀疑结肠直肠癌而其他相关检查不能明确诊断时,  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像结果仍具有一定的参考价值.

对于结肠直肠癌的局部淋巴结分期,  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像和 CT 一样, 诊断的灵敏度和阴性预测值都较低, 临床意义不大. 其原因一方面在于  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像通常不能显示小于 1 cm 的淋巴结转移灶, 另一方面也与结肠直肠癌所累及的淋巴结数量或转移淋巴结靠近原发肿瘤有关. 但对于结肠直肠癌病灶的远处转移(包括肝转移及其他肠道区域外的远端转移),  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像的优势显著. 许多相关报道显示:  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像对于结肠直肠癌肝转移的检查灵敏度和特异性均可高达 90 % 左右, 优于 CT 及 MRI.

$^{18}\text{F}$ FDG PET 显像的另一个显著的优势是探测结肠直肠癌病灶的复发. 在结肠直肠癌在盆腔内复发的早期阶段, 实验室检查和解剖学显像往往很难明确诊断. 报道显示  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像能有效地鉴别诊断瘢痕和癌病灶的局部复发, 检查的灵敏度和特异性分别在 91-94 % 和 80-100 %, 而 CT 则分别在 52-60 % 和 72-80 %. 同时由于  $^{18}\text{F}$ FDG PET 可一次全身显像, 显像结果还可明确是否会出现远处转移灶, 尤其当患者在随访过程中发现 CEA 升高而常规显像呈阴性表现时,  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像可及时发现结肠直肠癌的复发或探明近端或远端转移灶.

在监视疗效方面,  $^{18}\text{F}$ FDG PET 显像是否能够精确地评估结肠直肠癌病灶的状态目前尚无定论. 一般认为, 癌病灶在经过化疗或放疗后的短时间内由于炎症反应 FDG 摄取可能会增加, 而疗效的变化可能在放疗后 2-

6 mo内方都显现。

**2.2.2 胃癌** 正常的胃黏膜组织摄取 $^{18}\text{F}$ FDG存在较大的个体差异,且一些胃良性病灶(包括憩室、感染灶及胃镜检查创伤灶)也明显摄取 $^{18}\text{F}$ FDG,因此 $^{18}\text{F}$ FDG PET显像不能鉴别胃内原发病灶的良恶性。同时由于 $^{18}\text{F}$ FDG PET显像常不能检测微小的恶性病灶(小于1 cm),所以也不适用于胃癌的局部淋巴转移探查,尤其是位于胃内和胃周围的小淋巴转移灶。但 $^{18}\text{F}$ FDG PET显像可发现胃癌的远端转移(包括肝转移及肝外远端转移),诊断的准确度远高于CT和其他影像学检查。相关的研究报道显示:有12%的胃癌患者在术前通过患者 $^{18}\text{F}$ FDG PET显像发现存在远端转移(包括肝转移、纵隔或肺转移等)。另外,胃癌术后及放化疗前后进行 $^{18}\text{F}$ FDG PET显像有助于及时发现或明确远端转移,临床意义显著。

**2.3 其他PET肿瘤显像** 由于胃肠道系统的正常组织对 $^{18}\text{F}$ FDG的摄取存在相当大的变异,同时一些良性胃肠道疾病也可摄取 $^{18}\text{F}$ FDG,因此 $^{18}\text{F}$ FDG PET显像在诊断消化道肿瘤的应用中存在不可避免的假阳性。研究人员一直在寻求新的肿瘤显像剂以代替 $^{18}\text{F}$ FDG或弥补 $^{18}\text{F}$ FDG显像的不足。文献报道较多的是采用 $^{11}\text{C}$ -Acetate( $^{11}\text{C}$ 标记胆碱), $^{11}\text{C}$ -MET( $^{11}\text{C}$ 标记蛋氨酸)、 $^{11}\text{C}$ -ACPC、 $^{13}\text{N}$ -氨水、 $^{13}\text{N}$ -谷氨酸、 $^{18}\text{F}$ ET(氟代甲基酪氨酸)及 $^{18}\text{F}$ U等,其中以 $^{18}\text{F}$ ET和 $^{18}\text{F}$ U的临床应用前景较为乐观。

与 $^{18}\text{F}$ FDG不同, $^{18}\text{F}$ ET在肿瘤组织内的摄取及代谢过程反映了肿瘤细胞的蛋白合成代谢速率。许多研究报道显示: $^{18}\text{F}$ ET PET显像不仅可以显示 $^{18}\text{F}$ FDG呈阳性的癌病灶,同时也可显示某些糖代谢率不高(即 $^{18}\text{F}$ FDG显像呈阴性)的癌病灶,因此 $^{18}\text{F}$ ET PET显像至少可作为 $^{18}\text{F}$ FDG PET显像的补充手段以提高PET肿瘤显像的灵敏度。另有报道提示, $^{18}\text{F}$ ET PET显像还有助于鉴别癌病灶和炎性病灶,后者的 $^{18}\text{F}$ ET摄取率较低,因此 $^{18}\text{F}$ ET PET显像可望提高胰腺癌及其他胃肠道肿瘤的诊断准确率<sup>[7]</sup>。

针对胃肠道肿瘤的复发和转移的化疗药物中,5-FU(5氟尿嘧啶)是最常用的化疗药物之一,其抗肿瘤的方式有2种途径:一是整合到肿瘤细胞的RNA中,二是抑制DNA的合成。结肠癌病灶对于5-FU的治疗反应性存在相当大的个体差异性,有报道显示结肠癌患者对5-FU反应较高的可达80%以上,而低的仅为8%。尽管采取动脉插管化疗可以提高5-FU在肿瘤病灶的灌注率,但灌注率的提高并不意味着癌病灶对5-FU的摄取和滞留率相应增加。具有治疗指导意义的方法是采用 $^{18}\text{F}$ 标记5-FU进行 $^{18}\text{F}$ U显像,根据显像结果预先判断5-FU治疗的有效性,从而使化疗方案具有明确的针对性。Strauss et al<sup>[1]</sup>报道,静脉注射 $^{18}\text{F}$ U后30 min左右,肝转移癌病灶摄取 $^{18}\text{F}$ (5-FU)达峰值,此时及随后的连续显像可帮助确定5-FU在癌病灶内及周围正常肝组织内的转运率、陷留(trapping)或代谢率。2 h $^{18}\text{F}$ U显像测定的SUV值与5-FU的疗效比率呈现了较好的相关性。

由于正电子放射性核素有较好的理化和生物特性,

因此不少研究采用 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{18}\text{F}$ 等取代单光子放射性核素标记单克隆抗体以进行肿瘤免疫显像。但到目前为止,较成功的肿瘤免疫显像仍采用 $^{111}\text{In}$ 、 $^{131}\text{I}$ 及 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 作为显像核素。

### 3 免疫显像

肿瘤免疫显像是采用放射性核素标记抗体,再使标记抗体与肿瘤细胞表面(或细胞内的)特异抗原结合,从而实现肿瘤特异显像。早在1981年,Mach et al成功采用 $^{131}\text{I}$ 标记抗-CEA单克隆抗体(MoAb 23)进行了28例肿瘤显像,显像的灵敏度为50%。迄今为止,应用CEA单抗进行免疫显像的研究报道最多见,抗CEA单抗显像不仅适用于诊断结肠直肠癌(包括确定原发灶、肝转移灶、肝外转移以及进行复发灶监测和疗效判断),同时也适用于诊断胰腺癌及其他表达CEA肿瘤(如甲状腺髓样癌等)。蔡端<sup>[9]</sup>报道用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -标记的IMMU-4抗CEA单抗进行结肠直肠癌显像,对原发病灶和复发灶的诊断准确率分别为94%和92%,但也有报道显示抗CEA免疫显像对结肠直肠癌的检出率较低,同时还存在一定比例的假阳性和假阴性率。影响抗CEA免疫显像结果的因素较多,其中的关键因素包括肿瘤细胞表达CEA的水平及所制备标记单抗的质量。如患者血清有明显的CEA异常升高,抗CEA免疫显像结果有助于发现体内的隐匿性病灶,或明确结肠直肠癌原发灶的位置和性质;同时在结肠直肠癌的治疗和随访过程中再次出现CEA异常升高时,该显像结果有利于评价疗效或及时鉴别复发灶和发现转移灶。采用抗CEA免疫显像的另一个突出优势是为免疫治疗(包括毒素标记和大剂量 $^{131}\text{I}$ 标记抗CEA单抗)提供显像依据<sup>[12-20]</sup>。

针对胃癌的免疫显像,Saleem et al<sup>[20]</sup>报道采用 $^{213}\text{Bi}$ 标记单抗E-cadherin delta 9-1(E-cadherin突变存在于弥漫型胃癌组织内)进行免疫显像不仅可以示踪胃癌原发灶及局部淋巴转移的范围,而且可进行 $^{213}\text{Bi}$ 局部内放射治疗。Sakamoto et al<sup>[21]</sup>报道采用 $^{131}\text{I}$ 标记内皮素单抗用于诊断和治疗表达内皮素的胃肠道肿瘤<sup>[21-25]</sup>。

### 4 其他显像

肿瘤外科手术中关键的问题之一是需在术前或术中确定是否存在淋巴结转移,在胃肠道肿瘤中,胃癌和结肠直肠癌的淋巴检查意义尤其显著。与其他肿瘤的淋巴结核素探查相类似,胃癌和结肠直肠癌的淋巴结核素检查大致有2种类型:一是在手术前进行前哨淋巴结显像;二是在术中向原发灶内注射放射性淋巴示踪剂,再采用淋巴探测仪进行探查。检查所采用放射性药物均可作为阳性淋巴显像剂,其中目前最常用的是放射性胶体,如Tc-DX、Tc-硫化锑胶体、Tc-白蛋白胶体等,也有报道采用单抗显像剂。术前进行前哨淋巴结显像多见于直肠癌的淋巴引流显像。何超 et al<sup>[27]</sup>采用肛门镜直肠黏膜下注射淋巴显像剂,然后进行核素

显像显示直肠癌的淋巴结转移灶, 结果该方法用于直肠癌术前淋巴结转移的评估的敏感性为97.1%, 准确性达87.5%。但也有报道显示直肠癌术前的放射性核素淋巴显像在临床价值方面仍不及淋巴管造影<sup>[26-29]</sup>。

特殊类型的胃肠道肿瘤可分泌某些特定的激素成分或肿瘤细胞表面表达特殊的激素受体, 如胃小腸胰腺瘤(GEP)和一些胰腺癌组织可表达生长抑素(somostatin)受体。针对内分泌特殊受体的核素显像剂, 包括<sup>111</sup>In-octreotide、<sup>99m</sup>Tc-(V)DMSA及<sup>123</sup>I-MIBG等已经开始用于内分泌肿瘤显像, 同时也适用于探查或鉴别特殊类型的胃肠道肿瘤<sup>[30-33]</sup>。另外, 当临床怀疑胃肠道肿瘤出现骨转移时, 可采用<sup>99m</sup>Tc-MDP全身骨扫描以明确诊断。

## 5 参考文献

- 1 Strauss LG. Positron emitting radiotracers in gastrointestinal tract. In Wagner H. Nuclear Medicine. 3rd ed. New York: Saunders Press, 2000:1082-1089
- 2 Baum RP, Hor G. Single photon emitting radiotracers in gastrointestinal tract. In Wagner H. Nuclear Medicine. 3rd ed. New York: Saunders Press, 2000:1089-1094
- 3 Gupta N, Bradfield H. Role of positron emission tomography scanning in evaluating gastrointestinal neoplasms. *Semi Nucl Med* 1996;26:65-73
- 4 Rigo R, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, Benoit T, Foidart-Willems J. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* 1996;23:1641-1674
- 5 Barkin JS, Goldstein JA. Diagnostic approach to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:709-722
- 6 Bar-Shalom R, Valdivia AY, Blafox MD. PET imaging in oncology. *Semi Nucl Med* 2000;30:150-185
- 7 杨连粤. 评价<sup>2</sup>-[<sup>18</sup>F]氟-2-脱氧-右旋葡萄糖正电子发射断层扫描在慢性胰腺炎和胰腺癌鉴别诊断中的作用. 国外医学外科学分册 1999;26:310-312
- 8 李家敏, 孙启银, 赵军. <sup>18</sup>F-FDG PET显像在肝癌诊断及疗效评价中的应用. 中华核医学杂志 1998;18:181-183
- 9 蔡端. 应用FDG-PET以评估结肠直肠癌患者中不能解释的血浆CEA升高. 国外医学外科学分册 1998;25:319-320
- 10 Cook GJ, Fogelman I, Maisey MN. Normal physiological and benign pathological variants of 18-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography scanning: potential for error in interpretation. *Semi Nucl Med* 1996;26:308-314
- 11 李书权, 殷凤, 丁山. <sup>11</sup>C-胆碱和<sup>18</sup>F-氟代脱氧葡萄糖与正电子发射断层显像联用一种食管癌术前淋巴结分期的新方法. 国外医学放射医学核医学分册 2000;24:131-132
- 12 吴英德, 宋向群, 周德南, 胡晓桦, 甘友全, 李志革, 廖萍. 核素-抗AFP抗体-MMC双弹头导向治疗肝癌的实验和临床研究. 世界华人消化杂志 1999;7:387-390
- 13 匡安仁, 周绿漪, 梁正路, 谭天秩, 王朝俊. 放射性碘标记胰岛素在荷肝癌H22小鼠体内的趋瘤特性研究. 中华核医学杂志 1999;19:179-180
- 14 施乐华, 杨家和, 崔贞福, 孟孟超, 潘文舟, 孔令山, 王明库. 单抗TIGTC-III片段F(ab)<sub>2</sub>的制备及其放射免疫显像研究. 中国免疫学杂志 1999;15:35-36
- 15 蔡世荣, 詹文华. 放射标记抗体显像技术在肿瘤临床中的应用. 国外医学外科学分册 1999;26:10-15
- 16 张琴, 张一楚. 放射免疫导引手术应用进展. 国外医学肿瘤学分册 1998;25:132-133
- 17 李沛雨, 袁玫, 夏红天, 李力, 费丽华, 方永鑫, 蒋彦永, 阎锡猛. 抗新生血管内皮细胞单克隆抗体BVE-1治疗实体瘤的实验研究. 中华肿瘤杂志 1998;20:280-283
- 18 隋延仿, 何凤昌, 陈志南. <sup>131</sup>I-肝癌单克隆抗体Fab片段偶合物体内放射免疫显像研究. 中华医学杂志 1998;78:537-539
- 19 涂水平, 吴裕旸. <sup>99m</sup>Tc标记抗人结肠癌单克隆抗体88BV59H21-2V/67-66(Huma SPECT-Tc)用于复发、转移和隐匿性结直肠癌的放射免疫显像. 国外医学·消化系疾病分册 1999;19:118-120
- 20 Saleem A, Yap J, Osman S, Brady F, Suttle B, Lucas SV, Jones T, Price PM, Aboagye EO. Modulation of fluorouracil tissue pharmacokinetics by eniluracil: in-vivo imaging of drug action. *Lancet* 2000;355:2125-2131
- 21 Sakamoto J, Kojima H, Kato J, Hamashima H, Suzuki H. Organ-specific expression of the intestinal epithelium-related antigen A33, a cell surface target for antibody-based imaging and treatment in gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46(Suppl):S27-S32
- 22 Cheng PN, Saltz LB. Failure to confirm major objective anti-tumor activity for streptozocin and doxorubicin in the treatment of patients with advanced islet cell carcinoma. *Cancer* 1999;86:944-948
- 23 Bongers V, Verhaar-Langereis MJ, Hobbelen MG, Zonnenberg BA, de Klerk JM. Bone metastases in a patient with colon cancer depicted by Tc-99m carcinoembryonic antigen scintigraphy. *Clin Nucl Med* 2000;25:817-818
- 24 Behr TM, Behe M, Lohr M, Sgouros G, Angerstein C, Wehrmann E, Nebendahl K, Becker W. Therapeutic advantages of Auger electron- over beta-emitting radiometals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies. *Eur J Nucl Med* 2000;27:753-765
- 25 Buchegger F, Roth A, Allal A, Dupertuis YM, Slosman DO, Delaloye AB, Mach JP. Radioimmunotherapy of colorectal cancer liver metastases: combination with radiotherapy. *Ann NY Acad Sci* 2000;910:263-269
- 26 Adams S, Baum RP. Intraoperative use of gamma-detecting probes to localize neuroendocrine tumors. *Q J Nucl Med* 2000;44:59-67
- 27 何超, 黄学锋, 沈文华. <sup>99m</sup>Tc右旋糖酐的直肠淋巴引流显像及临床应用. 中华外科杂志 1999;37:712-714
- 28 刘放, 马思平, 王辉, 丁秀杰, 陈莉莉. 直肠癌患者术前淋巴管造影和放射性核素淋巴显像的临床价值评价43例报告. 中华普通外科杂志 1999;14:260-261
- 29 陈方, 李方, 杜延荣, 周前, 王世真, 梁宋平, 顾孝诚, 王凡. 肿瘤阳性显像剂<sup>111</sup>In-pentetreotide的制备和动物实验. 中华核医学杂志 1999;19:149-151
- 30 赵军, 林祥通. <sup>18</sup>F-FDG PET诊断肿瘤应考虑的几个问题. 国外医学·放射医学核医学分册 1999;23:241-244
- 31 Maguire D, O'Sullivan GC, Collins JK, Morgan J, Shanahan F. Bone marrow micrometastases and gastrointestinal cancer detection and significance. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1644-1651
- 32 Scott AM, Lee FT, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, Smyth FE, Murone C, Sturrock S, MacGregor D, Hanai N, Inoue K, Yamasaki M, Brechbiel MW, Davis ID, Murphy R, Hannah A, Lim-Joon M, Chan T, Chong G, Ritter G, Hoffman EW, Burgess AW, Old LJ. Specific targeting, biodistribution, and lack of immunogenicity of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3976-3987
- 33 Lerut T, Flamen P, Ectors N, Van Cutsem E, Peeters M, Hiele M, De Wever W, Coosemans W, Decker G, De Leyn P, Deneffe G, Van Raemdonck D, Mortelmans L. Histopathologic validation of lymph node staging with FDG-PET scan in cancer of the esophagus and gastroesophageal junction: A prospective study based on primary surgery with extensive lymphadenectomy. *Ann Surg* 2000;232:743-752

## 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗

程英升, 尚克中

程英升, 尚克中, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233  
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

程英升, 尚克中. 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1413-1415

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1413.asp>

## 0 引言

胃肠道肿瘤的介入治疗主要有血管介入治疗、非血管介入治疗和血管介入和非血管的双介入治疗三种方法。



显像显示直肠癌的淋巴结转移灶, 结果该方法用于直肠癌术前淋巴结转移的评估的敏感性为97.1%, 准确性达87.5%。但也有报道显示直肠癌术前的放射性核素淋巴显像在临床价值方面仍不及淋巴管造影<sup>[26-29]</sup>。

特殊类型的胃肠道肿瘤可分泌某些特定的激素成分或肿瘤细胞表面表达特殊的激素受体, 如胃小腸胰腺瘤(GEP)和一些胰腺癌组织可表达生长抑素(somostatin)受体。针对内分泌特殊受体的核素显像剂, 包括<sup>111</sup>In-octreotide、<sup>99m</sup>Tc-(V)DMSA及<sup>123</sup>I-MIBG等已经开始用于内分泌肿瘤显像, 同时也适用于探查或鉴别特殊类型的胃肠道肿瘤<sup>[30-33]</sup>。另外, 当临床怀疑胃肠道肿瘤出现骨转移时, 可采用<sup>99m</sup>Tc-MDP全身骨扫描以明确诊断。

## 5 参考文献

- 1 Strauss LG. Positron emitting radiotracers in gastrointestinal tract. In Wagner H. Nuclear Medicine. 3rd ed. New York: Saunders Press, 2000:1082-1089
- 2 Baum RP, Hor G. Single photon emitting radiotracers in gastrointestinal tract. In Wagner H. Nuclear Medicine. 3rd ed. New York: Saunders Press, 2000:1089-1094
- 3 Gupta N, Bradfield H. Role of positron emission tomography scanning in evaluating gastrointestinal neoplasms. *Semi Nucl Med* 1996;26:65-73
- 4 Rigo R, Paulus P, Kaschten BJ, Hustinx R, Bury T, Jerusalem G, Benoit T, Foidart-Willems J. Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluorodeoxyglucose. *Eur J Nucl Med* 1996;23:1641-1674
- 5 Barkin JS, Goldstein JA. Diagnostic approach to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:709-722
- 6 Bar-Shalom R, Valdivia AY, Blafox MD. PET imaging in oncology. *Semi Nucl Med* 2000;30:150-185
- 7 杨连粤. 评价<sup>2</sup>-[<sup>18</sup>F]氟-2-脱氧-右旋葡萄糖正电子发射断层扫描在慢性胰腺炎和胰腺癌鉴别诊断中的作用. 国外医学外科学分册 1999;26:310-312
- 8 李家敏, 孙启银, 赵军. <sup>18</sup>F-FDG PET显像在肝癌诊断及疗效评价中的应用. 中华核医学杂志 1998;18:181-183
- 9 蔡端. 应用FDG-PET以评估结肠直肠癌患者中不能解释的血浆CEA升高. 国外医学外科学分册 1998;25:319-320
- 10 Cook GJ, Fogelman I, Maisey MN. Normal physiological and benign pathological variants of 18-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography scanning: potential for error in interpretation. *Semi Nucl Med* 1996;26:308-314
- 11 李书权, 殷凤, 丁山. <sup>11</sup>C-胆碱和<sup>18</sup>F-氟代脱氧葡萄糖与正电子发射断层显像联用一种食管癌术前淋巴结分期的新方法. 国外医学放射医学核医学分册 2000;24:131-132
- 12 吴英德, 宋向群, 周德南, 胡晓桦, 甘友全, 李志革, 廖萍. 核素-抗AFP抗体-MMC双弹头导向治疗肝癌的实验和临床研究. 世界华人消化杂志 1999;7:387-390
- 13 匡安仁, 周绿漪, 梁正路, 谭天秩, 王朝俊. 放射性碘标记胰岛素在荷肝癌H22小鼠体内的趋瘤特性研究. 中华核医学杂志 1999;19:179-180
- 14 施乐华, 杨家和, 崔贞福, 孟孟超, 潘文舟, 孔令山, 王明库. 单抗TIGTC-III片段F(ab)<sub>2</sub>的制备及其放射免疫显像研究. 中国免疫学杂志 1999;15:35-36
- 15 蔡世荣, 詹文华. 放射标记抗体显像技术在肿瘤临床中的应用. 国外医学外科学分册 1999;26:10-15
- 16 张琴, 张一楚. 放射免疫导引手术应用进展. 国外医学肿瘤学分册 1998;25:132-133
- 17 李沛雨, 袁玫, 夏红天, 李力, 费丽华, 方永鑫, 蒋彦永, 阎锡猛. 抗新生血管内皮细胞单克隆抗体BVE-1治疗实体瘤的实验研究. 中华肿瘤杂志 1998;20:280-283
- 18 隋延仿, 何凤昌, 陈志南. <sup>131</sup>I-肝癌单克隆抗体Fab片段偶合物体内放射免疫显像研究. 中华医学杂志 1998;78:537-539
- 19 涂水平, 吴裕妍. <sup>99m</sup>Tc标记抗人结肠癌单克隆抗体88BV59H21-2V/67-66(Huma SPECT-Tc)用于复发、转移和隐匿性结直肠癌的放射免疫显像. 国外医学·消化系疾病分册 1999;19:118-120
- 20 Saleem A, Yap J, Osman S, Brady F, Suttle B, Lucas SV, Jones T, Price PM, Aboagye EO. Modulation of fluorouracil tissue pharmacokinetics by eniluracil: in-vivo imaging of drug action. *Lancet* 2000;355:2125-2131
- 21 Sakamoto J, Kojima H, Kato J, Hamashima H, Suzuki H. Organ-specific expression of the intestinal epithelium-related antigen A33, a cell surface target for antibody-based imaging and treatment in gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46(Suppl):S27-S32
- 22 Cheng PN, Saltz LB. Failure to confirm major objective anti-tumor activity for streptozocin and doxorubicin in the treatment of patients with advanced islet cell carcinoma. *Cancer* 1999;86:944-948
- 23 Bongers V, Verhaar-Langereis MJ, Hobbelen MG, Zonnenberg BA, de Klerk JM. Bone metastases in a patient with colon cancer depicted by Tc-99m carcinoembryonic antigen scintigraphy. *Clin Nucl Med* 2000;25:817-818
- 24 Behr TM, Behe M, Lohr M, Sgouros G, Angerstein C, Wehrmann E, Nebendahl K, Becker W. Therapeutic advantages of Auger electron-over beta-emitting radiometals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies. *Eur J Nucl Med* 2000;27:753-765
- 25 Buchegger F, Roth A, Allal A, Dupertuis YM, Slosman DO, Delaloye AB, Mach JP. Radioimmunotherapy of colorectal cancer liver metastases: combination with radiotherapy. *Ann NY Acad Sci* 2000;910:263-269
- 26 Adams S, Baum RP. Intraoperative use of gamma-detecting probes to localize neuroendocrine tumors. *Q J Nucl Med* 2000;44:59-67
- 27 何超, 黄学锋, 沈文华. <sup>99m</sup>Tc右旋糖酐的直肠淋巴引流显像及临床应用. 中华外科杂志 1999;37:712-714
- 28 刘放, 马思平, 王辉, 丁秀杰, 陈莉莉. 直肠癌患者术前淋巴管造影和放射性核素淋巴显像的临床价值评价43例报告. 中华普通外科杂志 1999;14:260-261
- 29 陈方, 李方, 杜延荣, 周前, 王世真, 梁宋平, 顾孝诚, 王凡. 肿瘤阳性显像剂<sup>111</sup>In-pentetreotide的制备和动物实验. 中华核医学杂志 1999;19:149-151
- 30 赵军, 林祥通. <sup>18</sup>F-FDG PET诊断肿瘤应考虑的几个问题. 国外医学·放射医学核医学分册 1999;23:241-244
- 31 Maguire D, O'Sullivan GC, Collins JK, Morgan J, Shanahan F. Bone marrow micrometastases and gastrointestinal cancer detection and significance. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1644-1651
- 32 Scott AM, Lee FT, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, Smyth FE, Murone C, Sturrock S, MacGregor D, Hanai N, Inoue K, Yamasaki M, Brechbiel MW, Davis ID, Murphy R, Hannah A, Lim-Joon M, Chan T, Chong G, Ritter G, Hoffman EW, Burgess AW, Old LJ. Specific targeting, biodistribution, and lack of immunogenicity of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma: results of a phase I trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3976-3987
- 33 Lerut T, Flamen P, Ectors N, Van Cutsem E, Peeters M, Hiele M, De Wever W, Coosemans W, Decker G, De Leyn P, Deneffe G, Van Raemdonck D, Mortelmans L. Histopathologic validation of lymph node staging with FDG-PET scan in cancer of the esophagus and gastroesophageal junction: A prospective study based on primary surgery with extensive lymphadenectomy. *Ann Surg* 2000;232:743-752

## 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗

程英升, 尚克中

程英升, 尚克中, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233  
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科. chengys@sh163.net  
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361  
收稿日期: 2003-03-08 接受日期: 2003-03-29

程英升, 尚克中. 胃肠道肿瘤血管和非血管双介入治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1413-1415

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1413.asp>

## 0 引言

胃肠道肿瘤的介入治疗主要有血管介入治疗、非血管介入治疗和血管介入和非血管的双介入治疗三种方法。

血管介入治疗主要为经血管的灌注术和灌注栓塞术. 非血管介入治疗主要为永久性带膜支架扩张术. 血管和非血管双介入治疗是血管介入治疗和非血管介入治疗的联合应用, 在胃肠道肿瘤的姑息治疗中, 具有较大价值<sup>[1]</sup>.

## 1 食管癌

1.1 血管介入治疗 血管介入治疗方法主要有超选择性食管动脉灌注化疗术. 赵振华<sup>et al</sup><sup>[2]</sup>对食管癌动脉插管化疗的靶动脉选择进行研究, 得出胸上段食管癌主要由支气管动脉或肋间动脉发出的食管支供血; 胸下段食管癌主要由食管固有动脉供血; 腹段食管癌主要由胃左动脉供血, 提出动脉插管化疗食管癌时, 应根据不同靶动脉并在相应高度及方向插管. 马广勤<sup>et al</sup><sup>[3]</sup>对不能手术的晚期食管癌患者, 采用支气管动脉、胃左动脉灌注, 取得一定的近期疗效, 达到了提高生存质量、延长生命的目的. 王麟川<sup>et al</sup><sup>[4]</sup>采用胃左动脉对贲门癌进行术前介入治疗可使肿瘤病灶较快缩小; 减轻肿瘤的浸润黏连; 增加肿瘤病灶周围的水肿; 有利于肿瘤的手术切除和剥离; 同时手术中出血量明显减少; 术后能有效地减少复发转移的机会. 谢其康<sup>et al</sup><sup>[5]</sup>对晚期贲门癌的介入治疗表明动脉灌注化疗是晚期贲门癌的一种安全、快速和有效的疗法.

1.2 非血管介入治疗 非血管介入治疗方法主要有X线引导下内支架置入术. 智发朝<sup>et al</sup><sup>[6]</sup>对63例食管贲门癌及癌患者放置内支架, 认为食管内支架是治疗食管贲门恶性狭窄的有效方法; 带膜支架治疗食管贲门癌合并食管气管瘘效果佳. 张伯生<sup>et al</sup><sup>[7]</sup>采用国产CZES自膨式带膜支架, 结合其他疗法综合治疗重症晚期食管癌、贲门癌患者151例, 认为可以获得满意疗效, 明显改善患者的生活质量, 增强体质. 杨仁杰<sup>et al</sup><sup>[8]</sup>在117例晚期食管癌患者中使用国产和进口支架放置术, 认为国产支架和进口支架在治疗效果上没有明显差异, 晚期食管癌患者的内支架姑息治疗是值得提倡, 能明显提高患者生活质量的好方法.

1.3 双介入治疗 双介入治疗主要为超选择性食管动脉灌注术和内支架置入术同时应用或交替应用. 宋金龙<sup>et al</sup><sup>[9]</sup>认为晚期食管癌进行支架成形术结合动脉灌注化疗, 可以明显改善患者生活质量, 延长生存时间. 王执民<sup>et al</sup><sup>[10]</sup>采用动脉灌注化疗及食管内支架治疗恶性食管狭窄, 认为食管内支架治疗恶性食管狭窄, 安全、可靠、疗效好、并发症少, 必须配合动脉灌注化疗, 否则易发生肿瘤性再狭窄. 崔进国<sup>et al</sup><sup>[11]</sup>对59例恶性食管狭窄患者置入内支架, 其中置入支架前行化学药物治疗和(或)放射治疗37例, 认为中晚期食管癌内支架置入术是解除吞咽困难有效的姑息治疗方法, 应用带膜支架和同时行化疗和放疗可防止因肿瘤生长而发生再狭窄, 延长患者生命.

## 2 胃和十二指肠癌

2.1 血管介入治疗 血管介入治疗方法主要有超选择性

动脉灌注化疗术(TAI)或化疗栓塞术(TAE). 李茂全<sup>et al</sup><sup>[12]</sup>对不能手术或术后复发的胃癌行TAI和TAE治疗, 1a生存率TAI组为25%, TAI+TAE组为60.7%, 得出TAI+TAE是晚期胃癌治疗行之有效的新方法. 卢武胜<sup>et al</sup><sup>[13]</sup>对手术前的胃癌患者进行选择性TAI, 发现经选择性TAI患者药物副反应轻微, 持续时间短, 临床症状改善明显; 术后病理显示其有效率为92%, 杀伤原发癌灶和周围转移淋巴结内癌细胞的效果显著高于全身化疗. 苏秀琴<sup>et al</sup><sup>[14]</sup>通过胃左动脉行丝裂霉素明胶微球(MMC-MS)栓塞的实验研究, 观察到MMC-MS主要栓塞于黏膜、黏膜下层血管, 引起水肿和局灶性细胞脱落、糜烂, 随着MMC-MS降解, 4wk时局部损伤恢复正常. MMC-MS栓塞胃左动脉引起的组织损伤是可修复的, 具有临床可行性. 李茂全<sup>et al</sup><sup>[15]</sup>对无手术指征胃癌(含术后复发)及合并转移患者行胃动脉内、转移灶化疗栓塞, 认为胃癌介入治疗的疗效评价应包括原发灶、转移灶和淋巴结改变, 反映疗效的是肿瘤内部结构的变化, 而非肿瘤大小的改变. 刘福坤<sup>et al</sup><sup>[16]</sup>通过观察40例胃癌患者术前经腹腔动脉或胃左动脉插管化疗后癌组织的血管形态和组织病理学变化, 认为介入治疗可以通过高浓度的化疗药物产生小血管和间质炎症, 使管腔狭窄或形成血栓, 影响肿瘤血供, 产生病理性坏死, 达到一定的治疗作用.

2.2 非血管介入治疗 非血管介入治疗方法主要有X线引导下内支架置入术. 茅爱武<sup>et al</sup><sup>[17]</sup>经口放置金属支架治疗胃、十二指肠及空肠恶性狭窄67例, 认为经口放置金属支架能有效缓解胃、十二指肠及空肠梗阻, 为提高晚期肿瘤患者的生活质量、延长其生存时间, 提供了姑息性治疗的方法.

2.3 双介入治疗 双介入治疗主要为超选择性动脉灌注术和内支架置入术同时应用或交替应用. 茅爱武<sup>et al</sup><sup>[18]</sup>采用内支架置入结合动脉内化疗治疗14例十二指肠恶性梗阻, 所有病例梗阻症状解除, 生存期明显延长, 为十二指肠恶性梗阻治疗提供有效的治疗经验.

## 3 结直肠癌

3.1 血管介入治疗 血管介入治疗方法主要有超选择性动脉灌注化疗术. 王大健<sup>et al</sup><sup>[19]</sup>经选择性肠系膜下动脉灌注化疗治疗直肠癌, 可以通过局部给药既能杀死肿瘤细胞而又能使小血管内皮变性、坏死, 以致闭塞血管. 还可刺激瘤周组织引起大量炎症细胞浸润及纤维组织增生, 加强对肿瘤的抑制作用, 防止癌细胞扩散和转移, 从而延长术后生存期. 刘勇敢<sup>et al</sup><sup>[20]</sup>对56例直肠癌根治术后经肠系膜上动脉、左(右)髂内动脉和肝固有动脉进行局部灌注化疗, 得出介入导管化疗可提高直肠癌根治术后的5a生存率, 显著降低肿瘤的复发率和转移率, 副作用少. 刘福坤<sup>et al</sup><sup>[21]</sup>通过对术前介入化疗对直肠癌细胞凋亡和增生的观察, 认为直肠癌介入治疗可暂时改善局部症状, 其机制可能是通过诱导癌细胞凋亡, 而且这种诱导作用是一持续过程, 在化疗

后7-10 d仍然起作用. 胡庭杨 et al<sup>[22]</sup>对术前病理证实的51例大肠癌经选择性肠系膜上、下动脉插管灌注抗癌药物后手术切除标本行组织学疗效观察, 认为术前动脉灌注抗癌药物治疗大肠癌组织学疗效显著, 可降低淋巴结转移率. 宋中金 et al<sup>[23]</sup>对20例大肠癌患者行超选择性插管化疗和明胶海绵栓塞, 认为大肠癌超选择性插管化疗和栓塞可改善临床症状, 提高手术切除率, 是治疗大肠癌的有效方法之一.

3.2 非血管介入治疗 非血管介入治疗方法有X线引导下内支架置入术. 茅爱武 et al<sup>[24]</sup>经肛门放置自膨式金属支架治疗4例横结肠恶性梗阻, 使梗阻即刻缓解, 生活质量提高, 是一种有效的姑息性治疗方法.

3.3 双介入治疗 双介入治疗主要为超选择性动脉灌注术和内支架置入术同时应用或交替应用. 宋中金 et al<sup>[25]</sup>对10例晚期直肠癌进行超选择性动脉灌注术和内支架置入术双介入治疗取得明显疗效.

## 4 胃肠道癌

4.1 血管介入治疗 血管介入治疗方法主要有超选择性动脉灌注化疗术. 苏杰<sup>[26]</sup>综述了国内外文献认为术后动脉灌注化疗、腹腔内化疗和术中腹腔内温热灌注化疗对进展期胃肠道癌肿有较大的价值.

4.2 非血管介入治疗 非血管介入治疗方法主要有X线引导下内支架置入术. 程英升 et al<sup>[27]</sup>对120例上胃肠道良恶性狭窄或阻塞患者进行介入治疗, 认为带膜或部分带膜金属支架是上胃肠道恶性狭窄或阻塞介入治疗的首选方法. 茅爱武 et al<sup>[28]</sup>对198例消化道癌行金属内支架置入术, 认为金属内支架置入术是解决消化道梗阻的有效方法, 对提高患者生活质量有较大的意义.

4.3 双介入治疗 双介入治疗主要为超选择性动脉灌注术和内支架置入术同时应用或交替应用. 茅爱武 et al<sup>[29,30]</sup>对215例和281例因恶性肿瘤浸润、压迫所致的消化道梗阻患者行动脉内灌注化疗药物和内支架安置双介入治疗, 认为支架放置后所有病例梗阻症状均获缓解或减轻, 接受双介入治疗者维持支架通畅时间较单纯支架治疗者长, 生存时间亦较后者明显延长, 得出动脉内灌药内支架放置双介入是标本兼治治疗消化道恶性梗阻的有效的姑息性疗法.

## 5 参考文献

- 程英升, 尚克中. 食管自扩金属支架(SEMS)的临床应用现状. 国外医学·临床放射学分册 1996;19:224-226
- 赵振华, 张光裕, 王彩娟, 吕卫工, 杨立新, 郑建民. 食管癌介入治疗靶动脉的选择与应用. 中国临床医学影像学杂志 1998;9:259-260
- 马广勤, 高从敬, 万向荣, 史跃, 陈才保. 晚期食管癌介入治疗的疗效探讨. 介入放射学杂志 1995;4:81-84

- 王麟川, 李文元, 缪万祥, 季红珍, 张国荣, 诸慧铭, 邹寿南, 汪守中. 贲门癌的术前介入治疗的方法. 介入放射学杂志 1992;3:27-29
- 谢其康, 李焕祥, 张西, 张晋强, 李元庆. 晚期贲门癌的介入治疗 - 附42例分析. 介入放射学杂志 1994;3:143-146
- 智发朝, 朱建新, 梁浓亮, 张兰军, 周丹, 潘德寿, 万田莫, 周殿元. 食管支架置入术治疗食管贲门癌性狭窄及瘘63例. 世界华人消化杂志 2000;8:947-948
- 张伯生, 姬曙光, 刘阳晨, 刘裕志, 潘元海. 应用带膜支架治疗晚期食管癌贲门癌. 中华胸心血管外科杂志 2000;16:261-263
- 杨仁杰, 祁吉, 高中度, 沈琳, 茅爱武, 陈辉, 沈龙. 内支架姑息治疗食管癌的临床应用. 中国肿瘤 2000;9:416-418
- 宋金龙, 李玉亮, 唐军, 刘作勤, 左玉宽, 王振亭, 王平海. 支架成形术结合动脉灌注化疗、放疗治疗晚期食管癌. 介入放射学杂志 2001;10:48-50
- 王执民, 吴智群, 王义清, 关燕, 徐金龙, 李文献, 董豪. 动脉灌注化疗及食管内支架治疗恶性食管狭窄. 实用放射学杂志 1999;15:13-15
- 崔进国, 孙兴旺, 王秀英, 赵钢, 潘新元, 何学文. 食管恶性狭窄内支架治疗和良性狭窄球囊扩张后的随访评价. 中华放射学杂志 1999;33:625-628
- 李茂全, 林贵, 王小林, 王建华, 颜志平, 董永华. 晚期胃癌动脉内化疗灌注与合用栓塞的临床研究. 介入放射学杂志 1992;1:35-38
- 卢武胜, 肖乾虎, 谢晓东, 官泳松, 张尚福, 杨开宇, 胡淑雨, 焦河. 胃癌选择性动脉灌注化疗的短期疗效研究. 介入放射学杂志 1994;3:147-149
- 苏秀琴, 孟祥文, 张进, 张彩珍. 胃左动脉丝裂霉素明胶微球栓塞的实验研究. 介入放射学杂志 2001;10:171-173
- 李茂全, 颜志平, 王建华, 王小林, 程洁敏. 胃癌介入治疗的疗效评价探讨. 介入放射学杂志 2000;9:28-31
- 刘福坤, 陈忠豪, 李国立, 祁晓平, 许哲, 黎介寿. 胃癌术前介入治疗后血管变化与癌组织坏死的关系. 华人消化杂志 1998;6:686-688
- 茅爱武, 杨仁杰, 刘寺义, 高斌, 程英升, 高中度. 经口放置金属支架治疗胃、十二指肠及空肠恶性狭窄67例. 介入放射学杂志 2001;10:42-44
- 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 程英升, 尚克中, 肖湘生. 内支架置入结合动脉内化疗治疗十二指肠恶性梗阻. 中华放射学杂志 1998;32:655-657
- 王大健, 裴云. 直肠癌的介入治疗 - 附36例报告. 介入放射学杂志 1994;3:216-217
- 刘勇敢, 高春芳. 介入导管动脉化学药物治疗对直肠癌根治术后患者生存率的影响. 中华普通外科杂志 1998;13:204-206
- 刘福坤, 祁晓平, 陈晓亮, 许哲, 黎介寿. 术前介入化疗对直肠癌细胞凋亡和增生的影响. 中华外科杂志 1999;37:225-227
- 胡庭杨, 袁建华, 茹国庆, 赵仲生, 罗祖炎, 刘子江, 俞文强, 蔡学祥, 陈方宏, 邓高里, 董全进. 大肠癌术前动脉灌注化疗的组织学疗效分析. 中国肿瘤 2001;10:44-45
- 宋中金, 唐华, 王鸿志, 林华, 刘启瑜, 于剑波. 大肠癌的超选择性动脉灌注化疗和栓塞治疗. 实用放射学杂志 2000;16:360-362
- 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 江伟骏, 蒋廷辉, 范红, 蒋聚魁. 经肛门放置自膨式金属支架治疗横结肠恶性梗阻的临床应用. 介入放射学杂志 1999;8:221-222
- 宋中金, 陈小萍, 唐华, 王鸿志, 雷作强. 晚期直肠癌的双重介入治疗10例分析. 川北医学院学报 2000;15:71-72
- 苏杰, 朱正纲. 进展期胃肠道癌肿区域性化疗的进展. 国外医学消化疾病分册 2001;21:10-13
- 程英升, 杨仁杰, 李明华, 尚克中, 陈维雄, 陈尼维, 储榆德, 庄奇新. 上胃肠道良恶性狭窄或阻塞的介入治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:1354-1360
- 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 江伟骏, 程英升, 范红, 蒋廷辉. 内支架治疗消化道恶性梗阻198例. 世界华人消化杂志 2000;8:369-370
- 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 范红, 蒋廷辉, 姜辉, 江伟骏. 动脉内灌药内支架安置治疗消化道恶性梗阻. 中国肿瘤 2000;9:413-415
- Mao AW, Gao ZD, Xu JY, Yang RJ, Xiao XS, Jiang TH, Jiang WJ. Treatment of malignant digestive tract obstruction by combined intraluminal stent installation and intra-arterial drug infusion. World J Gastroenterol 2001;7:587-592

# 肝细胞癌的诊断和治疗

陆 嵘, 房静远

陆嵘, 房静远, 上海第二医科大学附属仁济医院消化疾病研究所  
上海市 200001

陆嵘, 男, 1973-10-22 生, 上海市南汇县人, 汉族. 1997 年上海第二医科大学本科毕业, 2001 年上海第二医科大学硕士研究生, 主要从事消化系统肿瘤的分子机制研究.

项目负责人: 房静远, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海第二医科大学附属仁济医院消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com

电话: 021-62360930

收稿日期: 2003-05-14 接受日期: 2003-06-12

## 摘要

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见恶性肿瘤之一. 在西方国家, 过去 HCC 并非致死的主要原因, 但由于 HCV 的流行, HCC 发病率也逐渐增加. 本文主要涉及成人 HCC 患者的治疗, 包括以下问题: (1)确定需要监测的高危人群; (2)采取何种方法进行 HCC 的诊断; (3)选择最佳治疗方案.

陆嵘, 房静远. 肝细胞癌的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1416-1419  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1416.asp>

## 0 引言

肝细胞癌是常见的恶性肿瘤, 死亡率较高. 本文基本参照英国胃肠病学协会(british society of gastroenterology)的成人肝细胞癌诊断和治疗指南标准, 为我国临床医生提供肝细胞癌诊断和治疗的原则.

## 1 概述

1.1 用腹部超声及 AFP 检查进行监测能够发现肿块较小的 HCC.

1.2 HCC 的治疗效果取决于发现 HCC 时肿块的大小.

1.3 尽管如上所述, 但目前尚无确切的数据证实早期病灶的检出能够延长患者生存时间或节省医疗开支.

1.4 应该在下列高危人群中进行肝癌的监测 (1)乙肝病毒引起肝硬化的男性或女性患者, 尤其是仍有病毒复制的患者; (2)丙肝病毒引起肝硬化的男性或女性患者; (3)遗传性血色病引起肝硬化的男性或女性患者; (4)已戒酒或能配合治疗的酒精性肝硬化的男性患者; (5)原发性胆汁性肝硬化的男性患者.

1.5 自身免疫性肝炎、硬化性胆管炎引起肝硬化的男性或女性患者, 以及酒精性和原发性胆汁性肝硬化的女性患者中发生 HCC 的可能性较低.

1.6 监测方法包括每半年进行 1 次腹部超声和血清 AFP 检查. 腹部超声应该采用合适的专业设备和经验丰富的操作人员进行.

1.7 对于被监测人群, 应该告诉他们早期诊断的意义.

## 2 HCC 的诊断和治疗原则

2.1 HCC 的诊断 (1)肝硬化患者若存在肝脏病灶性损伤需高度怀疑 HCC 的可能; (2)腹部螺旋 CT(有无局部播散)和胸部螺旋 CT(有无转移)进行初步诊断; (3)MRI、血管造影术及 CT 随访有助于提高诊断的正确率; (4)一般不需要活检, 并且活检引起针道转移的发生率达 1-3%. 应该尽量避免对可能手术的病灶部位进行活检.

2.2 HCC 的手术治疗 唯一被证实有效的治疗方法仍是外科手术, 即肝脏切除术或肝脏移植术. 用于评价治疗效果的患者应符合单个小肝癌(小于或等于 5 cm)或至多 3 个小于 3 cm 的病灶. (1)对所有肝硬化和肿块较小的 HCC 患者(小于或等于 5 cm 的单个结节或至多 3 个不超过 3 cm 的病灶)都应考虑肝脏移植; (2)HBV 仍在复制的患者预后较差, 以前是不考虑进行肝移植的. 目前随着有效的抗病毒治疗, 对肿块较小的 HCC 患者可考虑肝移植; (3)在任何非肝硬化性肝癌患者(包括纤维板层样癌)中, 肝切除应该是首选的治疗方法; (4)肝功能良好(Child-Pugh A)的肝硬化患者如果不适合肝移植术, 也可选择实行肝切除术.

2.3 HCC 的非手术治疗 非手术治疗只适用于那些无法进行手术治疗的患者. (1)经皮乙醇注射(percutaneous ethanol injection, PEI)可导致较小癌灶的坏死. 该方法最适合直径小于 3 cm 的周围病灶. 射频消融术可能是一种较好的方法, 但目前还没有足够的数据证实其疗效; (2)化学栓塞能导致肿瘤坏死, 改善患者预后. 用碘油进行化学栓塞能有效治疗 HCC 引起的疼痛和出血; (3)化疗药物的有效率很低, 仅在新药试验时使用; (4)与对照组相比, 给予三苯氧胺治疗并不能改善生存率, 因此不推荐激素疗法.

## 3 背景

3.1 HCC 的流行病学 我国每年死于肝癌约 11 万人, 占全世界肝癌死亡人数的 45%. 在欧洲和美国 HCC 的发生率也呈上升趋势, 从 1980-1995 年, HCC 的发病率增加了 70%<sup>[1]</sup>. 目前对 HCC 的病原学已基本了解, HCC 在世界范围的流行与病毒性肝炎平行, 大部分病例与 HBV 或 HCV 有关. 酒精、遗传性血色病性肝硬化、原发性胆汁性肝硬化等也与 HCC 发病相关<sup>[2]</sup>. 在英国, 至多 40% 的病例以肝癌为肝脏疾病的首发表现, 而在日本 80% 的患者被发现 HCC 时是无症状的, 通

常是在对肝硬化患者进行筛查时被发现. 影响HCC发病的危险因素如下:

3.1.1 性别 研究发现男性HCC的发病危险性要高于女性<sup>[3]</sup>, 这是因为男性比女性更易发生HBV感染. HCV稍有不同, 男性与女性的患病比例是1.2:1, 而感染HBV的男女比例为1.9:1, 引起这种现象的原因尚不明确.

3.1.2 年龄 HBV感染率较低的地区, HCC的发病年龄很少低于45岁, 例如英国HCC发病的平均年龄为66岁. 在HBV感染率较高的地区, HCC发病年龄有两个峰值: 45岁和65岁<sup>[4]</sup>.

3.1.3 肝硬化的病史 90-95%的HCC患者存在肝硬化的病史<sup>[5]</sup>. 目前尚不清楚肝硬化本身在肿瘤发生过程中是否起着重要作用, 或者肿瘤与肝硬化是同时发生的, 只不过肝纤维化所需要的时间较短. 纤维板层样HCC的男女发病率相似, 平均年龄30岁. 非肝硬化性HCC的患者多有病毒性肝炎病史, 尤其是感染HBV后, 病毒能与宿主的DNA相整合. HCV及血色病患者也可发生非肝硬化性HCC, 但较少见.

3.1.4 肝脏疾病的病原学 不同原因引起肝硬化的患者, 其HCC发病危险性有着很大的变异. 病毒感染(HBV或HCV)有很高的危险性<sup>[6]</sup>. 每年进展为HCC的病毒性肝硬化患者占3-5%, 有些报道更是高达12%<sup>[7]</sup>. 在不同病原学的非病毒性肝硬化中, HCC发病危险性也不同. 遗传性血色病患者由于铁的沉着, 发展为HCC的危险性很高(年发病率7-9%)<sup>[8]</sup>. 相反, 自身免疫性肝硬化患者发生HCC的可能性很低. 酒精性肝硬化发生HCC的危险性也较高, 但由于患者继续摄入酒精, 且该类患者中心血管疾病的发病率很高, 因此这种危险性很难量化. 酒精性肝硬化的男性患者中HCC的年发病率为1-4%, 现有数据提示戒酒并不能阻止HCC的发展. 在女性中, 酒精性肝硬化的HCC发生率更难以计算, 但据少量的文献报道来看, 似乎略低于男性<sup>[9]</sup>. 原发性胆汁性肝硬化也有发生HCC的危险性, 但相关的文献报道非常少. 然而, 已有的数据提示女性患者, 即使已存在肝硬化, 发生HCC的可能性也较低<sup>[10]</sup>. Wilson's病很少见, 其确切的HCC发病率难以计算.

3.2 HCC的自然病程 HCC从小结节开始发展, 其无症状期可持续数年. HCC的体积倍增时间大约在1-19 mo<sup>[11]</sup>, 平均6 mo. 有人研究了未治疗的HCC患者的生存率, 结果表明影响生存率的主要因素与肝功能不全的严重程度和发现肿瘤时肿块的大小有关. 肝硬化Child-Pugh A级的患者如果不经任何治疗, 其1 a生存率为50-90%, 而只有29% Child-Pugh C级的患者不经治疗可以存活1 a. 发现肿瘤时肿块较小的HCC患者肿瘤体积倍增时间相对较长, 肿块小于5 cm的患者不经治疗的1 a生存率达81-100%, 3 a生存率为17-21%<sup>[11]</sup>.

3.3 HCC的筛查方法 甲胎蛋白(AFP)是最常用的检测HCC的肿瘤标志物, 正常范围10-20 ng/mL, 若超过400 ng/mL则有诊断意义. 但在直径小于4 cm的HCC中

有约2/3的AFP测定值低于200 ng/mL, 并有超过20%的HCC不表达AFP. 此外可以检测HCC中的AFP异质体, 但其诊断价值较低, 因此未被广泛采用. 异常凝血酶原也可作为诊断标志用于HCC, 在67%的HCC中发现升高, 但是小于2 cm的HCC仅8%有异常. AFP检测也可产生假阳性, 病毒性肝硬化的再生结节可引起AFP升高, 范围在20-250 ng/mL. 长时期的AFP升高, 即使未达400 ng/mL也高度提示HCC的诊断.

超声检查对较大的HCC有较高的特异性和敏感性, 但对小病灶的诊断价值较低. 富有经验的操作人员和专用的设备能提高诊断的正确率. 超声检查对直径3-5 cm的病灶准确率为85-95%, 对直径1 cm病灶为60-80%<sup>[12]</sup>. AFP和超声检查相结合能提高HCC的确诊率. 基于肿块倍增时间, 最初建议超声筛查的时间间隔为6 mo. 更高频率的检查有助于提高检查的敏感性, 但也会产生更多的假阳性结果. 如果超声检查阴性, 但AFP水平升高(未达HCC的诊断标准), 这类患者属于高危人群, 需要提高超声检查的频率(如3 mo).

3.4 HCC的筛查研究 HCC的筛查手段可以是单一的AFP检测, 但更多的是AFP与超声检查相结合. 在阿拉斯加进行了一项对HBsAg阳性患者的调查研究. 1982/1998, 研究者对2 230例HBsAg阳性患者进行了18 299次AFP检查. 20例发展为HCC, 有5例不宜手术, 14例进行了切除术, 但有6例复发<sup>[13]</sup>. 另一项对1069例HBsAg阳性患者的研究发现有4%被证实存在肝硬化, 14例肝癌, 其中6例进行手术治疗<sup>[14]</sup>. 使用超声和AFP检查对病毒性肝炎患者的前瞻性调查发现64-87%为单一肿块, 43-75%肿块直径小于或等于3 cm<sup>[15]</sup>.

3.5 HCC的诊断 临床上, 超声检查可发现肝脏肿块, 伴有AFP升高或不升高. 如果患者有肝硬化病史, 肿块直径大于2 cm, 则HCC的可能性高于95%, 若有AFP升高则可明确诊断<sup>[16]</sup>. 如果AFP正常, 需要进一步的影像学检查(CT、MRI、血管造影术等)<sup>[17]</sup>. 只有极少数无法确诊的患者需要进行肝脏活检. 超声检查对小肿块(直径小于2 cm)的确诊率较低, 最终证实为HCC的占75%<sup>[18]</sup>. 此时, 其他的影像学方法和AFP检测对诊断有决定意义. 若仍不能明确, 可对病灶大小进行随访, 经皮细针穿刺或活检来帮助诊断<sup>[19]</sup>. 肿瘤针道转移的危险性与肿块大小无关, 因此对有可能进行外科手术的患者, 应尽量避免活检.

患者没有肝硬化病史, 以肝脏肿块为首发症状, 先要检查AFP. 如果AFP升高, 排除了生殖系统疾病, 则可确诊. 若病灶允许手术, 则可对非瘤部位的肝脏进行活检来决定最佳的治疗方案. 如果AFP正常, 需寻找其他病因(如继发性), 采取进一步的影像学检查. 若怀疑HCC, 对非瘤部位的活检有助于手术方法的选择. 影像学检查对良性的肝脏病灶具有较高的特异性和敏感性, 因此只有高度怀疑的病例才有必要进行活检.

3.6 肝硬化并发肝癌患者的肝脏移植术和常规外科手术



目前尚没有关于 HCC 患者外科切除术和肝脏移植术预后的随机对照实验研究. 这两种方法主要适合较小的单一病灶, 并且只有少数患者能够同时具备这两种手术条件, 而手术方法的选择也受医疗条件和个体差异的限制.

早期的肝脏移植术效果较差, 患者 5 a 生存率低于 50%, 主要原因是肿瘤复发<sup>[20]</sup>. 目前已知对移植患者的选择十分重要. 直径小于 5 cm 的单一肿块或至多 3 个直径小于 3 cm 的肿块且没有血行转移, HCC 的复发率几乎为零<sup>[21]</sup>. HCC 切除术的短期生存率与移植术相似, 但 3 a 后移植术患者的存活率明显要高<sup>[22]</sup>. 切除术可能引起肝脏失代偿, 因此只适合肝功能良好的患者(Child Pugh A 级). 切除术的围手术期死亡率约 6-20%, 这与肝脏切除范围和术前的肝功能情况有关<sup>[23]</sup>. 多数的早期死亡与肝功能衰竭有关. 术后残余肝脏仍有较高的复发风险, 术后 5 a 的复发率高达 50-60%<sup>[24]</sup>. 多数复发病灶位于肝内, 表现为卫星结节或重新发生的肿瘤. 术前影像学检查不易发现这些小的卫星病灶, 如果进行术中超声检测则有可能被发现.

纤维板层样 HCC 的生物学特性不同, 外科切除术较少引起肝衰竭. 5 a 生存率 25-36%<sup>[25]</sup>. 除纤维板层样癌以外, 近 7% 的 HCC 并非起源于肝硬化. 非肝硬化性 HCC 的预后比肝硬化性 HCC 稍好, 手术切除的 5 a 生存率为 25%<sup>[26]</sup>. 肿瘤范围较广而无法切除的患者可以实施肝移植, 但疗效不佳. 有学者研究 77 例非肝硬化性 HCC, 肝脏移植的 5 a 生存率为 11%<sup>[27]</sup>. 因此对于此类患者, 手术切除仍是首选的治疗方法.

合并肝硬化的患者可以选择切除术或移植术. 在一些器官捐赠率较低的地区, 更多的是采取手术切除的方法. 对于较小肿块的肝硬化性 HCC 患者, 尤其是 Child-pugh A 级的肝硬化患者, 移植术能提供更好的治愈效果.

3.7 消融治疗 临床上还有许多 HCC 的非手术疗法, 特别是经皮消融治疗, 如 PEI, 已被广泛采用. 虽然 PEI 缺乏随机对照实验研究, 但已经有相当数量的文献报道. 对直径小于或等于 3 cm 的肿瘤的有效率约 75%, 5 a 生存率为 35-75%<sup>[28, 29]</sup>. PEI 的疗效与原有的肝功能情况密切相关, 肝功能 Child-Pugh A 级患者的 3 a 和 5 a 生存率分别是 79% 和 47%, Child-Pugh B 级患者分别是 63% 和 29%<sup>[29]</sup>. 这些研究的前提条件是 HCC 的肿块直径小于 5 cm. PEI 并发症较少见, 主要是针刺后引起肿瘤在针道内转移(3%)<sup>[30]</sup>和严重的胆管损伤(1%)<sup>[31]</sup>.

比较各种治疗方法发现对于直径小于 3 cm 的肿瘤, 手术切除、肝脏移植和 PEI 的术后生存率没有明显差异. 研究 260 例肿瘤直径小于 5 cm 的肝硬化患者(Child-Pugh A 级)发现手术的 3 a 生存率为 79%, 而 PEI 为 71%, 未经治疗者为 26%<sup>[32]</sup>. 目前多数认为如果存在治愈可能, 手术仍然是首选的治疗方法, 但 PEI 对不能手术者是最佳的治疗手段. 也有人利用顺铂, 冰醋酸等替代乙醇进

行治疗, 但其疗效尚不肯定<sup>[33, 34]</sup>.

射频消融术是一项很新的技术, 是在超声控制下将高频超声探头置入肝脏肿块的方法<sup>[35]</sup>. 高频超声波产生的热量聚集在探头从而破坏肿瘤组织. 单探头可以破坏 3 cm 的病灶, 多探头可以对直径 6 cm 的肿块进行治疗. 有学者研究 112 例射频消融术和 PEI 患者, 在 52 例经射频消融的患者中有 47 例经过平均 1.2 次治疗后肿瘤组织完全坏死, 60 例 PEI 患者中有 48 例经平均 4.8 次治疗达到完全消融<sup>[36]</sup>. 作者认为射频消融的有效率更高, 但并发症的发生率也较高. 有数据表明射频消融引起肿瘤播散的危险性较高.

3.8 栓塞 / 栓塞化疗 在不能手术的 HCC 患者中, 栓塞化疗作为首选的治疗方法而被广泛使用. 有足够的证据表明这种方法能使肿块显著减小, 对 HCC 引起的疼痛和出血也有很好的疗效. 栓塞化疗对较小的 HCC 疗效更好. 有研究发现, 采用栓塞化疗组患者 2 a 生存率为 63%, 单纯栓塞组为 50%, 未处理组为 27%. 这项研究确立了栓塞化疗的重要作用, 但栓塞化疗只适合于少数患者<sup>[37]</sup>. 栓塞化疗除了化疗药物(尤其是阿霉素)的副作用外, 还可引起动脉栓塞、疼痛、发热、肝功能失代偿及肝外器官栓塞. 严重并发症的发生率约 3-5%.

3.9 其他方法 激素疗法对 HCC 的疗效尚不确定, 主要药物有三苯氧胺、己烯雌酚和氟他氨等. 其疗效可能与患者雌激素受体的情况有关<sup>[38]</sup>. 静脉化疗对 HCC 的作用有限. 单一使用阿霉素的有效率仅 10-15%<sup>[39]</sup>. 作用更强的联合化疗对提高疗效没有太大帮助, 甚至可能降低生存率<sup>[40]</sup>. 有研究发现干扰素对丙肝后肝硬化患者具有预防 HCC 的作用<sup>[41]</sup>. 此外免疫疗法和视黄醛也可用来预防 HCC<sup>[42, 43]</sup>. 干扰素也用于 HCC 的治疗, 使用高剂量的  $\alpha$ -干扰素能提高患者生存率. 但也有报道认为干扰素治疗无效, 反而带来较多的副作用<sup>[44]</sup>. 有研究认为奥曲肽能提高 HCC 患者的生存率并显著降低 AFP 水平. 将 58 位患者随机分为治疗组和对照组, 治疗组给予奥曲肽 250  $\mu$ g, 2 次 /d, 结果治疗组平均存活时间是 13 mo, 对照组为 4 mo. 也有研究认为奥曲肽的疗效并不确定.

#### 4 参考文献

- 1 El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999;340:745-750
- 2 Goh J, Callagy G, McEntee G, O'Keane JC, Bomford A, Crowe J. Hepatocellular carcinoma arising in the absence of cirrhosis in genetic haemochromatosis: three case reports and review of literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:915-919
- 3 Lee CM, Lu SN, Changchien CS, Yeh CT, Hsu TT, Tang JH, Wang JH, Lin DY, Chen CL, Chen WJ. Age, gender, and local geographic variations of viral etiology of hepatocellular carcinoma in a hyperendemic area for hepatitis B virus infection. *Cancer* 1999;86:1143-1150
- 4 Lee HS, Han CJ, Kim CY. Predominant etiologic association of hepatitis C virus with hepatocellular carcinoma compared with hepatitis B virus in elderly patients in a hepatitis B-endemic area. *Cancer* 1993;72:2564-2567
- 5 Grando-Lemaire V, Guettier C, Chevret S, Beaugrand M, Trinchet JC. Hepatocellular carcinoma without cirrhosis in the West: epidemiological factors and histopathology of the

- non-tumorous liver. Groupe d' Etude et de traitement du carcinome hepatocellulaire. *J Hepatol* 1999;31:508-513
- 6 Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Kato N, Kanai F, Okudaira T, Teratani T, Tohgo G, Toda N, Ohashi M. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C-viral infection in Japan. *Hepatology* 1995;22:(4 Pt1):1027-1033
- 7 Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, Albertini A, Fasola M, Boffetta P, Nardi G. Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Brescia HCC Study. *Int J Cancer* 1999;81:695-699
- 8 Yang Q, McDonnell SM, Khoury MJ, Cono J, Parrish RG. Hemochromatosis-associated mortality in the United States from 1979 to 1992: an analysis of Multiple-Cause Mortality Data. *Ann Intern Med* 1998;129:946-953
- 9 Miyakawa H, Izumi N, Marumo F, Sato C. Roles of alcohol, hepatitis virus infection, and gender in the development of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20(Suppl 1):91-94
- 10 Howel D, Metcalf JV, Gray J, Newman WL, Jones DE, James OF. Cancer risk in primary biliary cirrhosis: a study in northern England. *Gut* 1999;45:756-760
- 11 Barbara L, Benzi G, Gaiani S, Fusconi F, Zironi G, Siringo S, Rigamonti A, Barbara C, Grigioni W, Mazziotti A. Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 1992;16:132-137
- 12 Columbo M, de Franchis R, Del Ninno E, Sangiovanni A, De Fazio C, Tommasini M, Donato MF, Piva A, Di Carlo V, Dioguardi N. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1991;325:675-680
- 13 McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP. Hepatitis B-related sequelae. Prospective study of 1400 hepatitis B surface antigen positive Alaska native carriers. *Arch Int Med* 1990;150:1051-1054
- 14 Sherman M, Peltekian KM, Lee C. Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population. *Hepatology* 1995;22:432-438
- 15 Solmi L, Primerano AM, Gandolfi L. Ultrasound follow-up of patients at risk of hepatocellular carcinoma: results of a prospective study on 360 cases. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1189-1193
- 16 Frazer C. Imaging of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:750-756
- 17 Bizollon T, Rode A, Bancel B, Gueripel V, Ducerf C, Baulieux J, Trepo C. Diagnostic value and tolerance of lipidol-computed tomography for the detection of small hepatocellular carcinoma: correlation with pathologic examination of explanted livers. *J Hepatol* 1998;28:491-496
- 18 Horigome H, Nomura T, Saso K, Itoh M, Joh T, Ohara H. Limitations of imaging diagnosis for small hepatocellular carcinoma: comparison with histological findings. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:559-565
- 19 Das DK. Cytodiagnosis of hepatocellular carcinoma in fine-needle aspirates of the liver: its differentiation from reactive hepatocytes and metastatic adenocarcinoma. *Diagn Cytopathol* 1999;21:370-377
- 20 Bismuth H, Chiche L, Adam R, Castaing D, Diamond T, Dennison A. Liver resection versus transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients. *Ann Surg* 1993;218:145-151
- 21 Achkar JP, Araya V, Baron RL, Marsh JW, Dvorchik I, Rakela J. Undetected hepatocellular carcinoma: clinical features and outcome after liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1998;4:477-82
- 22 Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Intention to treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation. *Hepatology* 1999;30:1434-1440
- 23 Lai EC, Fan ST, Lo CM, Chu KM, Liu CL, Wong J. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma: an audit of 343 patients. *Ann Surg* 1995;221:291-298
- 24 Adachi E, Maeda T, Matsumata T, Shirabe K, Kinukawa N, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Risk factors for intrahepatic recurrence in human small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995;108:768-775
- 25 Wood WJ, Rawlings M, Evans H, Lim CN. Hepatocellular carcinoma: importance of histologic classification as a prognostic factor. *Am J Surg* 1988;155:663-666
- 26 Iwatsuki S, Starzl TE. Personal experience with 411 hepatic resections. *Ann Surg* 1988;208:421-434
- 27 Houben KW, McCall JL. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in patients without underlying liver disease: a systematic review. *Liver Transpl Surg* 1999;5:91-95
- 28 Lin SM, Lin DY, Lin CJ. Percutaneous ethanol injection therapy in 47 cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma 5 cm or less: a long-term result. *Int J Clin Pract* 1999;53:257-262
- 29 Livraghi T, Giorgio A, Marin G, Salmi A, de Sio I, Bolondi L, Pompili M, Brunello F, Lazzaroni S, Torzilli G. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection. *Radiology* 1995;197:101-108
- 30 Ishii H, Okada S, Okusaka T, Yoshimori M, Nakasuka H, Shimada K, Yamasaki S, Nakanishi Y, Sakamoto M. Needle tract implantation of hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection. *Cancer* 1998;82:1638-1642
- 31 Di Stasi M, Buscarini L, Livraghi T, Giorgio A, Salmi A, De Sio I, Brunello F, Solmi L, Caturelli E, Magnolfi F, Caremani M, Filice C. Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma. A multicenter survey of evaluation practices and complication rates. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:1168-1173
- 32 Livraghi T, Bolondi L, Buscarini L, Cottone M, Mazziotti A, Morabito A, Torzilli G. No treatment, resection and ethanol injection in hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of survival in 391 patients with cirrhosis. Italian Cooperative HCC Study Group. *J Hepatol* 1995;22:522-526
- 33 Ohnishi K. Comparison of percutaneous acetic acid injection and percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998;45(Suppl 3):1254-1258
- 34 Ohnishi K, Yoshioka H, Ito S, Fujiwara K. Prospective randomized controlled trial comparing percutaneous acetic acid injection and percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27:67-72
- 35 Francica G, Marone G. Ultrasound-guided percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma by radiofrequency hyperthermia with a 'cooled-tip needle'. A preliminary clinical experience. *Eur J Ultrasound* 1999;9:145-153
- 36 Livraghi T, Goldberg SN, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L, Gazelle GS. Small hepatocellular carcinoma: treatment with radio-frequency ablation versus ethanol injection. *Radiology* 1999;210:655-661
- 37 Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1164-1171
- 38 Liu CL, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Poon RT, Wong J. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with tamoxifen and the correlation with expression of hormone receptors: a prospective randomized study. *Am J Gastroenterol* 2000;95:218-222
- 39 Schachschal G, Lochs H, Plauth M. Controlled clinical trial of doxorubicin and tamoxifen versus tamoxifen monotherapy in hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:281-284
- 40 Gebbia V, Maiello E, Serravezza G, Giotta F, Testa A, Borsellino N, Pezzella G, Colucci G. 5-Fluorouracil plus high dose levofolinic acid and oral hydroxyurea for the treatment of primary hepatocellular carcinomas: results of a phase II multicenter study of the Southern Italy Oncology Group (G. O.I.M.). *Anticancer Res* 1999;19:1407-1410
- 41 Inoue A, Tsukuma H, Oshima A, Yabuuchi T, Nakao M, Matsunaga T, Kojima J, Tanaka S. Effectiveness of interferon therapy for reducing the incidence of hepatocellular carcinoma among patients with type C chronic hepatitis. *J Epidemiol* 2000;10:234-240
- 42 Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T. Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Lancet* 2000;356:802-807
- 43 Muto Y, Moriawaki H, Saito A. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1999;340:1046-1047
- 44 Llovet JM, Sala M, Castells L, Suarez Y, Vilana R, Bianchi L, Ayuso C, Vargas V, Rodes J, Bruix J. Randomized controlled trial of interferon treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000;31:54-58

# DNA 高甲基化与抑癌基因

刘仲敏, 刘芝华, 吴 旻

刘仲敏, 刘芝华, 吴旻, 中国医学科学院, 中国协和医科大学肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021  
国家“973”重点基础研究项目资助, No. G1998051021  
项目负责人: 刘芝华, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院, 中国协和医科大学肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室.  
liuzh@pubem.cicams.ac.cn  
电话: 010-67723789 传真: 010-67715058  
收稿日期: 2002-12-05 接受日期: 2002-12-16

## 摘要

哺乳动物基因组中, DNA 甲基化是指 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶第5位碳原子被甲基化. DNA甲基化是一种基因外修饰, 不改变DNA的一级结构; 他在细胞正常发育、基因表达模式以及基因组稳定性中起着至关重要的作用. 全基因组低甲基化, 维持甲基化模式酶的调节失控和正常非甲基化 CpG 岛的高甲基化是人类肿瘤中普遍存在的现象. DNA高甲基化是导致抑癌基因失活的又一个机制. 本文综述了抑癌基因的高甲基化、DNA修复基因的高甲基化、甲基化与转录的关系以及导致转录失活可能存在的作用机制、寻找甲基化相关基因的依据原则、甲基化的检测方法、肿瘤甲基化图谱的特征、甲基化与突变的相互作用、导致甲基化产生的原因、及其广泛的应用前景.

刘仲敏, 刘芝华, 吴旻. DNA 高甲基化与抑癌基因. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1420-1424

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1420.asp>

## 0 引言

在哺乳动物基因组中, 胞嘧啶的第5位碳原子可以被的胞嘧啶<sup>[1]</sup>. DNA 甲基化是一种基因外(epigenetic)修饰, 他不改变DNA的一级结构并且在细胞正常发育、基因表达模式以及基因组的稳定性中起着至关重要的作用. DNA 甲基化模式是动态的. 例如, 在早期发育阶段, 受精后发育的特征是在全基因组范围内发生去甲基化, 接下来又发生区域性的甲基化, 这种基因组范围的DNA甲基化改变使甲基化模式得以建立. 甲基化模式的混乱与异常发育有关, 包括癌症.

DNA 甲基化的改变, 与遗传因素改变一样都是人类肿瘤的特点之一. 许多基因, 尤其是管家基因的启动子区富含 CpG 二核苷酸, 诸如此类启动子区定义为 CpG 岛. 除定位于失活 X 染色体上的基因和印记基因外, 正常细胞的 CpG 岛由于被保护而处于非甲基化状态. 全基因组低甲基化, 维持甲基化模式酶的调节失控和正常非甲基化 CpG 岛的高甲基化是人类肿瘤中普遍存在的现象. 以往的研究证明启动子区的高甲基化导致

抑癌基因失活是人类肿瘤所具有的共同特征之一, 而且这种高甲基化是导致抑癌基因失活的又一个机制. 1986 年, 有文章报道在肺癌和淋巴瘤中发现了位于 11 号染色体短臂的 calcitonin 基因存在高甲基化现象. 这一发现使更多的学者致力于 CpG 岛异常甲基化的研究中.

## 1 抑癌基因的高甲基化

人类肿瘤中, 抑癌基因 CpG 岛高甲基化 1989 年首次在视网膜母细胞瘤(Rb)基因中发现, 继首次在 H-ras 基因中发现突变之后. 后来证明 Rb 基因启动子的高甲基化可以显著下调体外报告基因的表达. 除了视网膜母细胞瘤中未发现该基因的甲基化.

直到 1994 年发现 VHL 基因的失活也与甲基化相关, 才确定肿瘤中启动子 CpG 岛高甲基化是基因失活的一个作用机制. 但是, 肿瘤中基因外失活现阶段的研究是始于 Stephen Baylin et al 发现抑癌基因 p16 的失活通常都采用 CpG 岛高甲基化的作用机制. p16 基因, 即 CDKN2A 基因, 一种细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白, 他可以抑制通过磷酸化使 Rb 蛋白失活细胞周期素 D 依赖性激酶的活性. p16 基因的失活将导致细胞丧失激活 Rb 基因的能力进而使细胞生长失去控制. p16 基因位于染色体 9p 的区域内, 许多肿瘤中该区段经常发生缺失、纯合性缺失和一些点突变, 这一现象提示该基因在肿瘤形成中发挥重要作用. 但是, 大量的研究表明在很多类型原位癌中很少能检测到该基因的纯合性缺失, 且在肿瘤中也很少能检测到 p16 基因的点突变. 事实上, 与 p16 基因失活相关的高甲基化是肿瘤中经常发生的事件之一. 最初有关 p16 基因甲基化的报道主要存在于肺癌、头颈癌、神经胶质瘤、结直肠癌和乳腺癌中. 后来这些研究几乎涉及所有上皮来源的癌, 但 p16 基因的甲基化不存在于小细胞肺癌和部分血癌中.

与 p16 基因相邻的 p15 基因, 在 Rb 基因的磷酸化调节中具有与其相似的结构和功能. p15 基因与 p16 基因经常同时缺失. 但是, 上述涉及的肿瘤中 p15 基因很少通过甲基化失活. 在许多血癌中可以检测到 p15 基因的高甲基化频繁发生.

乳腺癌散发性病例的乳腺癌易感基因 BRCA1 中没有检测到体细胞突变, 这一点提示可能是甲基化导致该基因的失活. 近来的研究工作已经证明在一小部分乳腺癌和乳腺癌细胞系的 CpG 岛中存在甲基化<sup>[2-4]</sup>. 但没有发现 BRCA2 基因存在甲基化<sup>[5]</sup>.

p73 基因, p53 基因的同源基因, 定位于 1 号染色体. 大量的报道表明, 与 p53 基因不同, 在该基因中很少能检测到突变. 近来的两篇报道已经发现在急性淋巴细胞白血病和淋巴瘤中 p73 基因表达失活与甲基化有关<sup>[6, 7]</sup>. p14<sup>ARF</sup> 基因具有调节 p53 蛋白稳定性的作用, 在部分结直肠癌细胞系中发生甲基化<sup>[8]</sup>.

## 2 DNA 修复基因的高甲基化

在肿瘤中, 可以发现参与 DNA 修复的基因经常由于启动子区高甲基化而失活. 第一个在前列腺癌中被证明的此类基因是谷胱甘肽转移酶(GST $\pi$ ), 实验证明甲基化异常发生在大多数前列腺癌中, 并且他还是导致该基因失活的原因. 同时也在乳腺癌和肾癌中发现这一基因被甲基化, 但在其他的肿瘤中很少发现这一现象<sup>[9]</sup>.

第二个具有肿瘤特异性甲基化的 DNA 修复基因是 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(MGMT). 近来的研究证明存在于该基因启动子区或第一外显子内的 CpG 岛甲基化与其转录失活有关<sup>[10]</sup>, 而且这种变化可以使染色质进入关闭状态, 进而导致核小体定位异常<sup>[11]</sup>. 该变化不仅存在于细胞系中, 也发生在原位癌中. MGMT 基因的甲基化异常多见于结直肠癌、部分淋巴瘤、肺癌以及脑肿瘤<sup>[12, 13]</sup>.

最后一个 DNA 修复基因是 MLH1. 许多工作发现存在于散发性结直肠癌、子宫内膜癌和胃癌中的微卫星不稳定性经常是该基因被甲基化后造成的<sup>[14-16]</sup>.

除上述基因外, 还发现其他一些基因, 如细胞因子信号抑制子(SOCS1)<sup>[17]</sup>、骨形成蛋白(BMP3B)<sup>[18]</sup>、RAS 效应同源物(RASSF1)<sup>[19]</sup>、E-钙黏素、胆固醇受体、雌激素受体、雄激素受体、维甲酸受体 $\beta$ 、CD44、FHIT 等基因在不同肿瘤中存在着甲基化现象.

## 3 甲基化与转录

现在已知 DNA 甲基化参与了基因的转录调节. 一些具有 CpG 二核苷酸结合位点转录因子间的相互作用属于甲基化敏感型. 但是甲基化 DNA 对转录的影响更多情况下是通过与甲基化 CpG 结合蛋白和改变染色质结构的相关因子之间的相互作用实现的.

MeCP1 和 MeCP2 是首先鉴定出的两个甲基化 CpG 结合蛋白. MeCP2 是单一多肽链, 包含一个与甲基化 CpG 结合的结构域(MBD)和一个转录抑制结构域(TRD)<sup>[20]</sup>. 另外四个甲基化 CpG 结合蛋白也具有 MBD(MBD1, MBD2, MBD3, MBD4), 并且 MBD2 具有使 MeCP1 复合物更易结合甲基化 DNA 的作用; 这些甲基化 CpG 结合蛋白具有直接抑制转录的作用, 也能够与转录共抑制子形成复合物; 后来发现 DNA 甲基转移酶(DNMTs)也具有这两种功能. 具有甲基化 CpG 结合活性蛋白抑制转录的机制有待于研究. 有证据表明这一过程是由许多复杂机制完成的. 一个主要机制包括甲基化 DNA 在 MBD 介导下与 Sin3 或 Mi-2/NuRD 形成共抑制复合物, 他们

反过来再与 HDAC1、HDAC2、两个 Rb 相关的组蛋白结合蛋白、RbAP46 和 RbAP48 组成核心组蛋白去乙酰化复合物<sup>[21-24]</sup>. 此外还存在其他共抑制复合物, 但是还没有证明他们在转录失活机制中的扮演什么样的角色. HDACs 可以使组蛋白 H3 和 H4 的 N 末端赖氨酸残基去乙酰化<sup>[25]</sup>, 从而导致组蛋白所带正电荷增加. 该组蛋白与带负电荷的 DNA 相互作用造成染色质结构压缩, 进一步可能通过限制转录因子的结合抑制转录作用. Mi-2/NuRD 共抑制复合物也包含通过 ATP 依赖机制重新包装染色质的因子. 上述活动可以使核小体在 DNA 上的定位发生改变, 进而可能限制 DNA 和转录因子之间的相互作用.

这一描述可能是比较简单. 首先, 染色质的重包装和组蛋白的去乙酰化是相互依赖的. 其次, DNA 甲基化可能需要 HDAC 的活动或染色质的重包装中的成分的参与. 第三, 事实上, HDACs 产生序列特异性的转录抑制因子导致基因失活, 因而通过 HDACs 发挥作用的转录抑制因子可能不仅仅作用于甲基化相关的位点. 类似地, 乙酰化和甲基化介导的抑制作用也可能单独发挥功能. 综合起来, 这些现象进一步体现了抑制基因的表达是 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、染色质的重包装和序列特异的失活机制彼此之间复杂的相互作用所导致的.

尽管甲基化通常与转录失活有关, 但在印迹座位中至少有两个例子是例外的, 他们的甲基化可以使转录激活.

## 4 甲基化的检测方法

科研工作者的首要目标应该是对通常情况下认为 CpG 岛的甲基化与转录失活相关的甲基化进行研究. 图 1 列出在肿瘤中寻找甲基化相关基因的一个依据原则.

有关特定基因 RNA 转录起始位点的描述为发现 DNA 甲基化可能在哪里发挥作用提供了线索. 如果 GenBank 中没有此方面的报道, 可以参考其他物种如老鼠启动子的相关信息. 同时也要考虑假基因的影响, 以便避免产生假阳性结果. 最后是以往研究发现并没有确凿的证据证明在体外利用去甲基化抑制剂使细胞系中失活的基因恢复表达, 该基因的失活就一定与甲基化有关. 原因在于该药可能间接地诱导基因表达. 获得确凿的证据的唯一方法是分析 CpG 岛的甲基化状态.

原则上首先可以利用亚硫酸氢盐和非亚硫酸氢盐的方法在肿瘤细胞系详细地研究 CpG 岛的甲基化. 亚硫酸氢盐测序的研究有利于设计出区别甲基化和非甲基化模式的引物. 细胞系也允许利用去甲基化抑制剂对其进行处理, 以便研究基因去甲基化和恢复表达的情况. 对于原位癌, 诸如甲基化特异性 PCR(MSP)的方法可进行大量标本的筛查.

要对 CpG 岛的 DNA 甲基化模式进行较深入的了解, 必须利用亚硫酸氢盐修饰过的 DNA 进行研究. 亚

硫酸氢盐可以使非甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶不发生改变.这种方法造成甲基化和非甲基化 DNA 序列的差异.该方法中 DNA 的完全变性以及胞嘧啶完全转变为尿嘧啶均可避免产生假阳性结果.

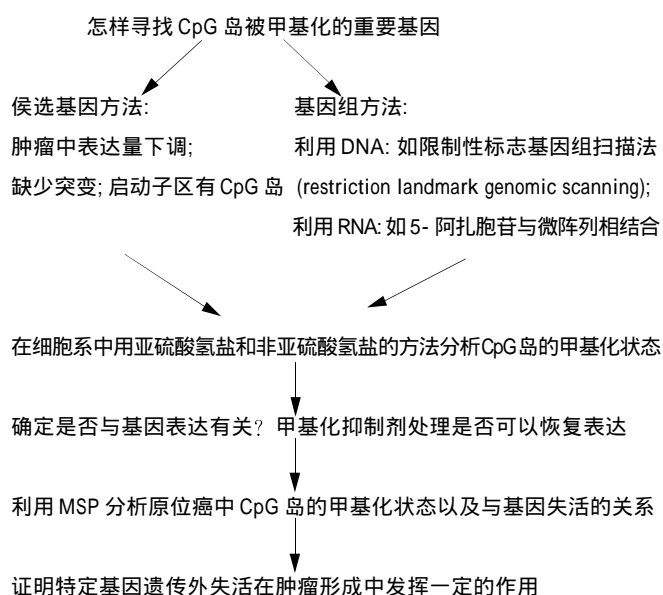


图 1 寻找与转录失活相关甲基化的方法.

以亚硫酸氢盐修饰为基础,用于 CpG 岛甲基化分析的研究方法包括以下两种:(1)测序.测定亚硫酸氢盐修饰过 DNA 的序列是检测胞嘧啶甲基化最直接的方法.利用 PCR 反应扩增修饰过的 DNA,获得目的基因双链 DNA.可以对该产物直接进行序列分析;也可以将其克隆测序获得单链 DNA 的甲基化图谱.(2)MSP.在研究 CpG 岛甲基化中,MSP 是应用最广泛的一种技术.利用亚硫酸氢盐修饰造成甲基化和非甲基化 DNA 序列差异,可以设计出各自特异性引物.该技术的极高灵敏度允许他对小量样本的 DNA 进行甲基化研究,包括来自石蜡包埋样品或显微切割组织的 DNA.由于 MSP 方法的多种优点,他被认为是人类肿瘤甲基化分析中是一种快速、高效临床研究手段.最后,另外一种 MSP 是“Methylight”,他利用荧光标记的时 PCR 技术进行检测<sup>[26]</sup>,荧光检测大大提高了该方法的灵敏度.别的方法包括结合亚硫酸氢盐的限制性分析;甲基化敏感的单核苷酸引物延伸法;甲基化敏感的单链构象分析.

## 5 基因甲基化信号通路、图谱及意义

肿瘤是涉及多重信号通路和遗传损伤的一种疾病,他们在肿瘤的形成中是必不可少的.基因外损伤也同样如此. CpG 岛甲基化所涉及的基因分别参与了细胞周期(p16<sup>INK4a</sup>, Rb), DNA 修复(MGMT, hMLH1), 细胞黏附(CDH1)等过程.过去的 3 a 中,肿瘤中启动子发生甲基化的基因数量增加的相当快.这种不断发现可能导致研究者相信所有他们感兴趣的基因均可能发生异常甲基化,并且在肿瘤形成中具有同等重要的作用. Esteller

同时对以往有关甲基化的部分工作进行了分析,发现如下规律:(1)根据肿瘤类型可以建立 CpG 岛甲基化图谱. Esteller et al<sup>[27]</sup>已经证明这种甲基化的特定模式同样存在于肿瘤起源的组织中.参考以往报道的文献,可以发现有些类型的肿瘤比别的肿瘤更易发生甲基化:例如最容易甲基化的肿瘤主要起源于胃肠管道,而诸如卵巢癌一类的肿瘤则很少发生甲基化<sup>[27]</sup>.另外一个结论是具有不同程度 CpG 岛甲基化的肿瘤呈梯度分布.因而,不大可能存在一种所有 CpG 岛均甲基化的肿瘤.(2)染色体上是否存在异常甲基化的热点?核内是否有控制甲基化的因子?许多最近发表的文章已经报道出通过甲基化导致转录失活的基因都位于 3 号染色体短臂附近的同一区域<sup>[28, 29]</sup>.该区段在许多肿瘤中存在很高频率的杂合性丢失,尤其在非小细胞肺癌中.许多学者对该区段进行突变检测,但一无所获.答案似乎是一些基因的失活可能与甲基化有关.但还无法确定这一区域是否属于异常甲基化热点.(3)大量 CpG 岛发生甲基化基因的基因组结构具有如下特征:他们通常具有两个不同的启动子,且都有 CpG 岛.主要转录产物来自于强启动子,而弱启动子则是少量转录产物起始处.如 APC、ER 等基因均属于上述类型.

## 6 甲基化与突变的比较

过去一直认为许多肿瘤的形成主要是基因突变引起的.但 20 年后只发现癌基因 K-ras 和抑癌基因 p53 在许多不同类型的肿瘤中存在较高频率的突变.现在已发现越来越多基因的失活可能与甲基化有关.但是,赋予他在肿瘤发生及发展过程中扮演着关键性的角色最重要的发现是甲基化导致特定基因失活的证实.如 DNA 修复基因,他们由于甲基化失活可能改变细胞的整个遗传环境.甲基化相关 MGMT 的失活可以引起参与结直肠癌形成过程的癌基因 K-ras 中 G 到 A 的转换<sup>[30]</sup>,即外基因损伤可以引起在肿瘤发展中起关键性作用基因的遗传损伤<sup>[30, 31]</sup>.由于启动子甲基化而失活的其他一些基因可能与 DNA 损伤相关.

遗传外损伤与遗传损伤可能是相互作用的.遗传改变同样也影响参与甲基化模式建立和维持过程中基因作用.如 DNMT3b 基因生殖细胞中的突变与异常甲基化有关,但与肿瘤无关<sup>[32]</sup>.

CpG 岛甲基化经常发生在缺乏基因突变的情况下,说明二者在导致基因失活的过程中发挥同等重要的作用.另一个证明基因启动子甲基化在肿瘤细胞中发挥重要作用的途径是研究其恢复表达的效应.例如通过去甲基化或转基因的方法都可以恢复由于甲基化失活基因的表达.

## 7 甲基化产生的原因

导致肿瘤甲基化模式改变的机制尚不清楚,其可能原因有以下几种:(1)保护 CpG 岛免受甲基化因子的丢失.



从以往的研究可知, Ap<sub>1</sub> 基因胚胎细胞的 CpG 岛通过一个尚未证实的保护顺式作用元件与 CpG 岛边缘的 Sp1 位点相结合, 而使其处于去甲基化状态<sup>[33]</sup>. (2) 肿瘤中 DNA methyltransferase (DNMT) 的过度表达. 大量证据表明, DNMT1 在肿瘤中的表达是上调的<sup>[34]</sup>. 但也有报道显示 CpG 岛的高甲基化与 DNMT1 的表达水平无关. (3) DNMT 复合物受到破坏. 另一个潜在的因素可能与 DNMT 水平升高有关, 即指这些酶的酶相关或抑制成分的调节失控. 该失控可能由于与 DNMTs 形成复合物的 一种或几种因子(例如 pRb, DMAP1-DNMT 结合蛋白) 的丢失所致. (4) 复制时序性的破坏. 基因组的复制在细胞周期 S 期通过空间和短暂模式得以实现. 在此过程中的变化使复制区域和染色质构成的区域无法正常地相互作用. CpG 岛可能通过复制时序紊乱发生异常甲基化. 有证据表明, 肿瘤细胞具有一个比较不同步的复制时序.

## 8 甲基化的应用

尽管基因启动子的高甲基化和基因表达失活之间的关系有待于进一步阐明, 但是人们日益重视 DNA 甲基化在肿瘤早期诊断和预后分析中, 以及在肿瘤的预防和治疗中可能具有的重要作用. 以 DNA 甲基化为基础的标志物可以应用于肿瘤细胞的检测、肿瘤类型的识别和肿瘤治疗三个主要临床领域中.

与基因突变不同, CpG 岛启动子甲基化位点在一个基因中是恒定的. 对于所有的患者来说, 在某一个已知基因中只需单一类型的引物, 利用甲基化特异性 PCR 便可检测肿瘤特异性甲基化的变化情况. 且与杂合性缺失不同, 该 PCR 产物呈阳性, 这一特点为上述检测提供方便.

与基因改变不同, 遗传外改变是可逆的. 恢复启动子甲基化所引起失活关键基因的表达有助于逆转肿瘤细胞的表型. 人们可以为 DNA 去甲基化设计出象 5-Aza C (5-aza-2-deoxycytidine) 一样更为特异的药品用于肿瘤治疗. 近期的研究发现, 用 HDAC (histone deacetylase) 抑制子使高甲基化基因发生部分去甲基化可以恢复其表达活性, 这一实验结果在临床上具有广泛的应用前景.

遗传外改变已经成为肿瘤中最重要的分子事件之一. 某些抑癌基因 CpG 岛甲基化的发现将 DNA 甲基化与破坏多种信号通路的遗传改变联系起来. 启动子的高甲基化现在被认为是基因失活的真正的作用机制之一. 但是, 还有许多重要问题有待解决, 如保护 CpG 岛免受甲基化因子的鉴定; 甲基化通过什么途径导致基因失活等. 最后, 甲基化在肿瘤患者的分子治疗中有广泛的用途, 而且可能成为未来治疗方法的作用靶点.

## 9 参考文献

- Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5237-5242
- Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1997;57:3347-3350
- Mancini DN, Rodenhiser DI, Ainsworth PJ, O' Malley FP, Singh SM, Xing W, Archer TK. CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site. *Oncogene* 1998;16:1161-1169
- Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene* 1998;17:1807-1812
- Collins N, Wooster R, Stratton MR. Absence of methylation of CpG dinucleotides within the promoter of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 in normal tissues and in breast and ovarian cancers. *Br J Cancer* 1997;76:1150-1156
- Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A, Said J, Tatsumi E, Koeffler HP. Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 1999;94:1113-1120
- Corn PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Compitello N, Baylin SB, Herman JG. Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 1999;59:3352-3356
- Robertson KD, Jones PA. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol* 1998;18:6457-6473
- Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998;58:4515-4518
- Qian XC, Brent TP. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the 06-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 1997;57:3672-3677
- Patel SA, Graunke DM, Pieper RO. Aberrant silencing of the CpG island-containing human 06-methylguanine DNA methyltransferase gene is associated with the loss of nucleosome-like positioning. *Mol Cell Biol* 1997;17:5813-5822
- Herfarth KK, Brent TP, Danam RP, Remack JS, Kodner IJ, Wells SA Jr, Goodfellow PJ. A specific CpG methylation pattern of the MGMT promoter region associated with reduced MGMT expression in primary colorectal cancers. *Mol Carcinog* 1999;24:90-98
- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene 06-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793-797
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6870-6875
- Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:462-466
- Yamamoto H, Perez-Piteira J, Yoshida T, Terada M, Itoh F, Imai K, Perucho M. Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology* 1999;116:1348-1357
- Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth suppression activity. *Nat Genet* 2001;28:29-35
- Dai Z, Lakshmanan RR, Zhu WG, Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Brena RM, Li B, Wright FA, Ross P, Otterson GA, Plass C. Global methylation profiling of lung cancer identifies novel methylated genes. *Neoplasia* 2001;3:314-323

- 19 Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000;25: 315-319
- 20 Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-389
- 21 Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 1997; 89:349-356
- 22 Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 1997; 89:373-380
- 23 Gibbons RJ, McDowell TL, Raman S, O'Rourke DM, Garrick D, Ayyub H, Higgs DR. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* 2000;24:368-371
- 24 Knoepfler PS, Eisenman RN. Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 1999;99:447-450
- 25 Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 1998;20:615-626
- 26 Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32
- 27 Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61:3225-3229
- 28 Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD. 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:3581-3585
- 29 Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF, Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13954-13959
- 30 Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germa JR, Herman JG, Capella G, Peinado MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:299-304
- 31 Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; 61:4689-4692
- 32 Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999;402:187-191
- 33 Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001;20:3156-3165
- 34 Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 1998; 72:141-196

## 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中。综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分。通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号。

(世界胃肠病学杂志 2002-12-18)

# 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展

沈 波, 朱金水

沈波, 朱金水, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233  
项目负责人: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科. zhujs1803@hotmail.com  
电话: 021-64369181-8351  
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-12-05

## 摘要

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其预后差, 只有40%的就诊患者能进行手术治疗, 即使进行完全切除的患者, 胃癌的复发率非常高. 由于胃癌血供复杂多变的特点, 及血管生长因子影响肿瘤生长学说的兴起和血管生长抑制剂的不断发现, 其抑制实体肿瘤生长及转移的实验研究和临床上的应用, 使进展期胃癌的治疗趋于多元化, 并且近年兴起的血管介入化疗中, 不断新的辅助化疗方案的研究, 以提高患者行手术治疗的比率及改善生活质量. 其中自体干细胞支持下超选择局部动脉化疗在肿瘤治疗上的应用, 其减少药物的副反应, 提高有效率, 延长生存期的优势, 为晚期胃癌的治疗提供了新的方向.

沈波, 朱金水. 胃癌供血及其动脉介入化疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1425-1428

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1425.asp>

## 0 引言

胃癌是消化道最常见的高度恶性的肿瘤, 死亡率高, 在治疗上面临很大的挑战. 手术切除是早期胃癌的首选, 但胃癌的血供非常的复杂多变, 血行传播是继胃癌淋巴, 腹腔转移的又一重要转移途径, 尤其早期胃癌由于血行转移而复发率高. 而多数进展期胃癌手术预后差, 局部复发, 远处转移发生率高, 故术后亦需进行辅助治疗, 其中以化疗为主, 化疗中以介入化疗为常用. 所以发展有效的治疗方案, 寻找新的治疗方法是提高生存率的主要途径. 本文对胃癌血供特点及其介入治疗的进展进行综述.

## 1 胃癌组织血供

1.1 动脉血供 胃的供血动脉来自腹腔干的分支, 沿胃大、小弯形成两个动脉弓. 由该弓发出许多小支在胃壁内互相吻合, 形成丰富的血管网. 由腹腔干发出的胃左动脉, 主要供应胃贲门、胃前、后壁, 及肝门附近部分区域, 与多起自肝固有动脉的胃右动脉终支吻合形成胃小弯动脉弓. 胃右动脉走向幽门上缘附近, 沿胃小弯发出许多小支至胃前、后壁. 胃网膜右动脉是胃十二指肠的分支, 沿胃大弯发出多数小支至胃前、后壁及大

网膜, 其终支与脾动脉发出的胃网膜左动脉吻合形成胃大弯弓. 同是脾动脉发出的胃短动脉分布于胃底部的前、后壁. 此外, 还有来自胃左动脉或腹腔干的膈下动脉的一小逆行支, 分布于胃底上部. 而且, 据统计, 有60-80%的人出现起于脾动脉的胃后动脉, 供应胃体后壁的上部.

1.2 静脉回流 胃左静脉与胃右静脉在胃小弯与同名动脉伴行, 离开胃壁后, 分别汇入门静脉或其属支. 与胃大弯弓并行的静脉弓由胃网膜左右静脉合成, 收纳胃及大网膜的静脉支, 胃网膜左静脉向左注入脾静脉或其属支, 胃网膜右静脉注入肠系膜上静脉. 胃短静脉与动脉伴行, 多进入脾内, 注入脾内静脉. 但胃癌形成中, 静脉和小静脉发生高度屈曲, 囊状形成, 扩张等变化, 并形成大量的动静脉吻合, 这使血流直接从动脉分流到静脉而造成某些物质(如抗肿瘤递质等)不能释放入肿瘤. 临床运用腹腔动脉造影时能看到胃的所有分支, 在DSA超选择性胃左动脉、肝动脉或胃十二指肠动脉造影时, 不但能使插管的动脉和其他动脉分支显影, 而且可看到胃壁下的静脉.

1.3 微循环 胃小弯或胃大弯动脉弓上发出的胃支, 穿过肌层, 进入黏膜下层, 互相吻合, 形成黏膜下丛. 胃体黏膜中, 从深部到表面, 黏膜毛细血管数量逐渐增多, 并汇集入表面小静脉网, 这些微循环网起着阻止深部致癌物质穿透屏障的作用. 而在胃窦部, 在黏膜同一水平, 缺乏相应的相互连接的毛细血管, 且存在终末动脉. 胃体与胃窦黏膜微循环结构和分布的不同以至血流量的不同, 是胃窦部增生细胞易被致癌物质侵入且发生胃癌较多的主要原因<sup>[1]</sup>. 有研究显示早期胃癌(侵入深度限于黏膜或黏膜下层), 不同的生长模式, 他们的微血管密度(MVD), 血管内皮生长因子(VEGF)的表达也不同, 其影响到肿瘤的恶性程度、血行和淋巴的转移、手术的预后及复发的频率<sup>[2]</sup>.

## 2 新生胃癌肿瘤血管

肿瘤血管系统高度变异, 不遵从正常血管形成规则. 而且不同肿瘤血管的形态也不同, 由肿瘤细胞的生长状态所决定. 1971年Folkman首先提出“肿瘤生长依赖于血管生成”的观点. 当肿瘤细胞置入宿主组织, 肿瘤血管生成因子促使毛细血管芽苞的形成, 最终形成肿瘤微循环网. 因而肿瘤血管有两种来源: (1)招募宿主已存在的血管网; (2)新生血管的形成. 研究中激光多普勒测定胃腺癌血流显示相对于正常胃壁, 胃腺癌边缘的

血流高,而中央低,并且胃癌分期中T大于或等于3的血流大于T小于3.目前认为血管生成在肿瘤生长中起重要作用.用化学免疫技术,CD31,CD35和CD34抗原或von Willebrand 因子特异性标记肿瘤血管形成内皮细胞发现胃腺癌形成许多新生小血管,尤其在肿瘤边缘<sup>[3]</sup>.故新生胃癌肿瘤血管为胃癌的诊断和分期提供了新的思路.

### 3 血供对肿瘤的影响

Algire et al 在 1954 即提出通过阻断肿瘤血流(TBF)来停止肿瘤的营养供应,并发现一种叫鬼臼毒素的物质可完全阻断 TBF,但因毒性太大而不能应用于临床.1971年, Folkman 假定如果肿瘤血管生长因子被抑制,那就能有效的抑制实体肿瘤.目前,许多研究者大量实验发现并证实了一些血管生长因子抑制剂可期待应用于临床抑制肿瘤的生长及转移.如血管生成因子的中和抗体,分子整合素,生长因子受体,激酶抑制剂,天然产物,抗生素的衍生物(如 TNP-470),细胞外基质蛋白片段(如内皮抑素),还有近来发现 V 型胶原的 NC1 结构域有抗血管生成因子及延迟肿瘤生长的作用.并且新发现一种细胞因子合成衍生物(NM-3),其以半衰期短(3-10 h),低毒性,并实验显示能选择性地抑制内皮细胞增生,迁移,出芽及肿瘤血管形成,而引起研究者的广泛关注<sup>[4]</sup>.

众多的血管生成因子抑制剂中已用于胃癌方面研究的有 TNP-70, 内皮抑素等. TNP-470 是烟曲霉素的衍生物,现已可人工合成,其通过抑制血管内皮细胞增生而抑制肿瘤血管生成,有效且无毒性<sup>[5]</sup>.原发和继发肿瘤的生长和播散,均需要新生血管形成,新生血管是原发肿瘤播散至继发部位的通道,也是继发灶增生的前提.基于此, Kanai et al 以人胃腺癌裸鼠原位种植转移模型为实验对象,用 TNP-470 作治疗实验,结果表明, TNP-470 可抑制原位胃癌的新血管生成,并阻止肿瘤细胞进入血液循环,而阻止血行转移.而且 TNP-470 还可抑制胃癌的腹膜播散,但其机制目前仍不清楚<sup>[6,7]</sup>.因此,长期应用低毒性的血管生成抑制剂,在限制肿瘤生长及转移中有着潜在的价值和临床应用前景.

内皮抑素由 O' Reilly et al 在 1997 年从鼠血管内皮瘤细胞的培养上清液中分离出来.经动物实验初步证实,内皮抑素对肿瘤血管内皮细胞生长具有强烈的抑制作用,是迄今发现的疗效最好的血管生长抑制因子,且尚未发现毒副作用,也无耐药性.他针对血管内皮细胞,能特异性抑制肿瘤血管内皮细胞增生,减少肿瘤血管增生,并诱导胃癌细胞凋亡,对体内胃癌的生长和转移均有强烈的抑制作用. Hajitou et al 发现其抑制作用与负向调节血管内皮生长因子在肿瘤细胞上的表达有关<sup>[8-10]</sup>.

目前研究发现一种新的风车子碱 A-4 (COMBRETAS TATIN A-4)复合物的衍生物 AC7700,并在动物 AC7700 静脉注射实验中证实其能减少肿瘤血流和抑制肿瘤生长

(包括肝、胃、肾等实体瘤)且不会引起严重的副作用<sup>[11]</sup>.

总之,血管生成抑制剂能减少肿瘤新生血管的生成,从而抑制肿瘤的生长和转移,并在动物实验中取得很好的疗效,而且其毒副作用小甚至无毒副作用,为胃癌的治疗提供了新的方向.

### 4 介入治疗对胃癌肿瘤的影响

4.1 胃癌动脉化疗对胃癌的疗效 早期胃癌,手术切除是治疗的首选方案,但由于大部分患者来就诊时就已经是进展期胃癌,单纯手术的疗效差,化疗成为当今综合治疗胃癌的重要手段之一.然而胃癌对于常规静脉化疗效果不佳,且该类患者在治疗后有较大的毒副作用及免疫功能的下降,患者不能很好的耐受,且延长生存期及改善生活质量的效果不佳.由于全身静脉化疗存在选择性低,毒副作用大的问题,1969 年 Fujimoto et al 就进行了经股动脉逆行插管到腹腔动脉及胃左动脉给药的化疗方法实验,以期使化疗更具选择性以提高疗效并能使副作用降到最低,最后也证实了该方法确实能提高生存率和延长生存期.近年来国内外的临床实验研究显示高选择动脉插管化疗治疗胃癌由于药物直接进入肿瘤血管,局部浓度高,且能避免常规静脉化疗时药物同血浆蛋白结合失去抗癌活性,故可明显提高抗癌效果,且毒副作用低,能提高手术切除率,对防止术中瘤细胞医源性扩散、种植及术后复发也有重要的临床意义.

Tao et al 对 110 例胃癌随机行术前局部动脉化疗 (PRACT),其肿瘤细胞的凋亡指数( $12.5 \pm 4.33$ )高于未行该治疗的组( $7.1 \pm 3.43$ ),且肿瘤细胞增生指数( $33.8 \pm 8.8\%$ )低于未行 PRACT 组( $43.6 \pm 12.8\%$ ),实验证明 PRACT 主要通过抑制肿瘤细胞的增生并诱导其凋亡而抑制胃癌的生长,能提高胃癌患者的预后,其 5a 生存率明显高于未行 PRACT 的患者<sup>[12]</sup>.并且近几年的临床研究显示,对已诊断为晚期胃癌合并邻近脏器(如胰、肝脏等)及淋巴结转移或侵入,不能行手术切除的患者,行全身(CDDP 和 UFT)及局部(5-FU, DXR 和 MMC)动脉灌注化疗,结果显示患者的生存时间延长并在治疗中保持一个较好的生活质量<sup>[13]</sup>.

4.2 胃癌动脉化疗合并局部动脉栓塞对胃癌的影响 随着动脉介入化疗的日益成熟,临床上在动脉灌注的基础上发展局部动脉栓塞化疗以提高疗效.目前我们所谓的胃肠道恶性肿瘤的血管内插管治疗主要以插管灌注和栓塞化疗为主.药物灌注化疗可使肿瘤局部药物浓度增高,灌注后栓塞治疗可使局部药物浓度维持时间更长.胃癌因晚期不能手术,或体弱,或年龄大难耐受手术的患者可行血管内插管灌注化疗.因胃癌大部分发生在胃小弯侧及胃窦部,大多插管化疗选胃左动脉,因胃属于空腔脏器,以往不主张进行栓塞化疗,以避免胃壁的坏死和穿孔.近来,有少数病例在胃大动脉灌注化疗基础上进行栓塞化疗,并未发现有脏器穿孔.主要与

栓塞剂量少, 胃壁可立即建立侧支循环有关, 治疗后肿瘤缩小, 症状缓解. 认为胃癌栓塞化疗作为姑息治疗是有效和可行的. 而现在更多的用于胃癌肝转移后肝动脉插管灌注和栓塞化疗, 但 Tarazov 对胃癌肝转移患者 12 例采用(5-Fu/ADM)经导管动脉灌注与 12 例(ADM+碘油+凝胶海绵)化学栓塞治疗进行临床对照, 经导管动脉灌注, 92 % 有阳性效果而化学栓塞为 50 %, 且前者中位生存期 23 mo, 而后者只有 8 mo, 结果显示经导管动脉灌注化疗对胃癌肝转移是有效的, 在临床上对进行化疗的患者应首选, 当其疗效不显著时再采用栓塞化疗<sup>[14]</sup>.

4.3 进展期胃癌化疗方案及新方法 临床报道 ECF 方案(表柔比星, 顺铂, 5-Fu)对晚期胃癌患者有显著的疗效并提高生存质量. 长期的跟踪随机研究显示 ECF 比常规 FAMTX 方案(5-Fu, MTX, ADM)有明显的优势<sup>[15, 16]</sup>. ECF 的总有效率 46 % 及中位生存期为 8.7 mo, 而 FAMTX 分别为 21 % 和 6.1 mo. 目前许多研究者普遍认为 ECF 方案可作为标准治疗方案, 但对其治疗优势的机制仍不很清楚, 尚需要进行更深入的研究.

虽然最近进展期转移胃癌的化疗方案有所发展, 但大多数方案的临床疗效一般. EORTC 实验对 245 例采用 FAMTX, ELF(VP16, 甲酰四氢叶酸, 5-Fu), 和 FUP(5-FU, 顺铂)三种治疗进展期胃癌的化疗方案进行比较, 总有效率 FAMTX 12 %, ELF 9 %, FUP 20 %, 中位生存期分别为 6.7, 7.2, 7.2. 结果显示三者之间没有明显差异<sup>[17]</sup>. 近期, 日本研究者对 61 个胃癌发展期和复发的患者进行 FLEP 方案(5-FU, LV, ETP, CDDP)局部和全身化疗, 总有效率为 36.1 %, 中位生存期为 11.80 mo<sup>[18]</sup>. 还有用新的辅助化疗方法, 如小剂量的 CDDP+5-FU+MTX/5-FU 续灌治疗, 或 FLP 方案(5-FU, LV, CDDP)在临床少数个例上取得较好的疗效, 但未用于大量的临床实验<sup>[19, 20]</sup>.

近来研究发现拓扑异构酶抑制剂 CPT-11, 草酸铂, 及抗代谢物 GEM 等新的递质, 可单药化疗, 或作为化疗方案的组成, 在发展期胃癌中起积极的治疗作用.

CPT-11 单独用于抗肿瘤时效率为 43 %, 而与 CDDP 联合化疗则有 48-59 % 的有效率. 目前 Newman et al 正用 CPT-11+CDDP 对 22 个晚期胃癌患者进行化疗追踪研究其复发和生存情况. 而 Blanke et al 二期临床实验中用 CPT-11 与 5-Fu 及 LV 对 31 个进展期胃癌患者进行联合化疗研究显示其总有效率为 22 %. 且大量研究显示患者对 CPT-11+CDDP, 和对持续 24h 5-Fu+CDDP 灌注的有效率是相近的<sup>[21, 22]</sup>.

Louvet et al 的二期研究显示草酸铂+5-Fu+LV 作为第一线的治疗方案对 36 个进展期合并转移的胃癌患者进行治疗具有很好的耐受性, 总有效率和生存期分别为 50 %、11 mo<sup>[22]</sup>. 且 GEM+CDDP 二期实验也显示具有相似的化疗结果<sup>[22]</sup>.

总之, 虽然目前研究发展了许多化疗方案, 但他们对进展期胃癌的临床疗效没有显著提高, 所以至今仍没有一个最佳的化疗方案可作为治疗进展期胃癌标准方案, 我们需要寻找新的方法以达到更好的临床疗效.

4.4 自体干细胞支持下超选择局部动脉化疗对胃癌的影响 虽然辅助化疗对进展期胃癌行或未行手术的患者预后有一定的提高, 但其较大的毒副作用影响了化疗药物的疗效, Taguchi et al 报道在对 96 例进展期胃癌采用 EAP 方案(ETP, ADM, CDDP)介入化疗治疗中仍有 50 % 有较强的骨髓抑制, 甚至有 2 例因血小板降低而死亡<sup>[23]</sup>. 因此, 需要寻找一种既能使化疗保持高有效性又能将化疗的副作用降到最低水平的治疗中晚期胃癌的新方法. 研究发现血干细胞的移植在减少化疗副作用, 特别是骨髓抑制方面等有着很好的效果. 自体骨髓移植(ABMT)及自体外周血干细胞的移植(APBSCT)支持下的超剂量化疗已经在治疗如乳腺癌, 急性粒细胞白血病, 淋巴瘤等恶性肿瘤中取得肯定的疗效<sup>[24, 25]</sup>. 而 APBSCT 与 ABMT 相比, 有移植后造血及免疫重建早, 并发症少, 采集方便, 不需麻醉等优点. Suzuki et al 对 10 个晚期胃癌患者进行 ABMT 支持下高剂量 EAP 化疗(ETP 1200 mg/m<sup>2</sup>, ADM 80 mg/m<sup>2</sup>, CDDP 120 mg/m<sup>2</sup>), 结果示所有患者都能度过再障期而无严重的并发症且有效率 89 %<sup>[26]</sup>. Berdel et al 二期初步临床研究报道在对 16 例进展期上消化道癌采用在自身干细胞支持下, 术前 EAP 方案化疗, 再连续的高剂量 MCVB 化疗, 初步实验显示患者对其有较好的耐受性, 并能提高疗效, 临床上具有很好的可行性<sup>[27]</sup>. 但目前 APBSCT 支持下超选择性胃癌供血动脉管化疗中晚期胃癌的报道少见, 本文认为其可作为一个为此类患者提供有效而低毒副作用的治疗方案, 提高治疗有效率, 延长临床缓解期, 提高中晚期胃癌患者的生活质量.

总之, 随着分子生物新技术运用和临床新的发现及发展, 我们期望抗血管生成因子等新的治疗进展期胃癌的方法能尽快应用于临床, 而另一方面在目前的介入化疗的基础上能进一步的改善化疗方案, 或寻找新的化疗方法降低毒副作用, 提高临床疗效, 加快胃癌治疗的进展.

## 5 参考文献

- 1 Sorbye H, Westby J, Ovrebo K, Kvinnsland S, Svanes K. Role of blood flow in protection against penetration carcinogens into normal and healing rat gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 1995; 40:2509-2515
- 2 Tomoda M, Maehara Y, Kakeji Y, Ohno S, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Intratumoral neovascularization and growth pattern in early gastric carcinoma. *Cancer* 1999;85:2340-2346
- 3 Schilling MK, Redaelli C, Friess H, Blum B, Signer C, Maurer CA, Büchler MW. Evaluation of laser Doppler flowmetry for the study of benign and malignant gastric blood flow in vivo. *Gut* 1999;45:341-345
- 4 Reimer CL, Agata N, Tammam JG, Bamberg M, Dickerson WM, Kamphaus GD, Rook SL, Milhollen M, Fram R, Kalluri R, Kufe D, Kharbanda S. Antineoplastic effects of chemo-



- therapeutic agents are potentiated by NM-3, an inhibitor of angiogenesis. *Cancer Res* 2002;62:789-795
- 5 Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990;348:555-557
  - 6 Kanai T, Konno H, Tanaka T, Matsumoto K, Baba M, Nakamura S, Baba S. Effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on the progression of human gastric cancer xenotransplanted into nude mice. *Int J Cancer* 1997;71:838-841
  - 7 Yoshikawa T, Yanoma S, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Noguchi Y. Angiogenesis inhibitor, TNP-470, suppresses growth of peritoneal disseminating foci. *Hepatogastroenterology* 2000;47:298-302
  - 8 O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin. An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285
  - 9 张国锋, 王元和, 张明敖, 王强, 罗芸葆, 韩策然, 陆友国, 饶应阳. 内皮抑素对胃癌抑制作用的实验研究. *中华外科杂志* 2002;40:59-61
  - 10 Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart J, Noel A. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin associated with a down regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J* 2002;16:1802-1804
  - 11 Hori K, Saito S, Kubota K. A novel combretastatin A-4 derivative, AC7700, strongly stanches tumour blood flow and inhibits growth of tumours developing in various tissues and organs. *Br J Cancer* 2002;86:1604-1614
  - 12 Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454
  - 13 Kobayashi M, Kasakura Y, Fujii M, Mochizuki F, Kochi M, Eguchi T, Imai S. Curative resection of advanced gastric cancer responding to preoperative chemotherapy-a case report. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:527-530
  - 14 Tarazov PG. Transcatheter therapy of gastric cancer metastatic to the liver: preliminary results. *J Gastroenterol* 2000;35:907-911
  - 15 Chi KH, Chao Y, Chan WK, Lo SS, Chen SY, Yen SH, Chen KY, Wu CW, Lee SD, Lui WY. Weekly etoposide, epirubicin, cisplatin, 5-fluorouracil and leucovorin: an effective chemotherapy in advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1984-1988
  - 16 Waters JS, Norman A, Cunningham D, Scarffe JH, Webb A, Harper P, Joffe JK, Mackean M, Mansi J, Leahy M, Hill A, Oates J, Rao S, Nicolson M, Hickish T. Long-term survival after epirubicin, cisplatin and fluorouracil for gastric cancer: results of a randomized trial. *Br J Cancer* 1999;80:269-272
  - 17 Vanhoefer U, Rougier P, Wilke H, Ducreux MP, Lacave AJ, Van Cutsem E, Planker M, Santos JG, Piedbois P, Paillot B, Bodenstein H, Schmoll HJ, Bleiberg H, Nordlinger B, Couvreur ML, Baron B, Wils JA. Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide, leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: A trial of the european organization for research and treatment of cancer gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Clin Oncol* 2000;18:2648-2657
  - 18 Mochizuki F, Fujii M, Kasakura Y, Kochi M, Wakabayashi K, Eguchi T, Tsuneda Y, Kanamori N, Kaiga T, Kobayashi M. FLEP therapy for advanced and recurrent gastric cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:1542-1545
  - 19 Hirota M, Kimura J, Eguchi T, Kato K, Kobayashi H, Kanazumi N, Suzuki Y, Ishii M. A patient with advanced gastric cancer surviving for more than 5 years after neoadjuvant chemotherapy and curative resection. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29:125-129
  - 20 Yabusaki H, Nashimoto A, Tanaka O. A complete response after neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer with esophageal invasion. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29:119-123
  - 21 Newman E, Marcus Stuart G, Milan P, Sanjeev S, Herman Y, Joan S, Mary H, Franco M, Howard H. Neoadjuvant chemotherapy with CPT-11 and cisplatin downstages locally advanced gastric cancer. *J Gastrointest Surg* 2002;6:212-223
  - 22 Sun W, Haller DG. Recent advances in the treatment of gastric cancer. *Drugs* 2001;61:1545-1551
  - 23 Aguchi T. Arterial infusion chemotherapy, tokyo. *Jpn J Cancer Chmother Pub Inc* 1994:276-281
  - 24 Chen YC, Hsueh EJ, Ho CL, Kao WY, Wan HL, Chao JY. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with malignancies: the Tri-Service general hospital experience. *Zhonghua YiXue ZaZhi (Taipei)* 2001;64:395-407
  - 25 Fetscher S, Brugger W, Bertz H, Krieger G, Kanz L, Mertelsmann R, Lange W. High-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation for metastatic gastric leiomyosarcoma. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:787-788
  - 26 Suzuki T, Ochiai T, Nagata M, Koide Y, Gunji Y, Nakajima K, Yokoyama T, Kashiwabara H, Isono K. High-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer* 1993;72:2537-2542
  - 27 Berdel WE, Heldmann T, Thiel E. Long-term results of a phase-II-pilot trial on preoperative high dose chemotherapy with stem cell rescue in patients with cancer of the upper gastrointestinal tract. *Oncol Rep* 2001;8:341-342

# 腹膜粘连的分子机制及药物防治

曾 健, 李晓辉

曾健, 中国人民解放军第 254 医院 天津市 300042  
李晓辉, 中国人民解放军第三军医大学药理教研室 重庆市 400038  
项目负责人: 李晓辉, 400038, 重庆市沙坪坝高滩岩, 中国人民解放军第三军医大学药理教研室. xhl@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-68753397 传真: 023-68753397  
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-03

## 摘要

腹膜粘连在剖腹术后发生率很高. 其机制与组织缺血、损伤、异物刺激引发的局部过度炎症反应以及由此导致的腹膜纤溶活性降低、腹膜纤维蛋白胶状物形成和溶解动态平衡失调、组织纤维蛋白酶原激活剂活性降低、纤维蛋白酶原抑制剂活性增高有关; 其中转化生长因子 $\beta$ 、血管内皮生长因子、肿瘤坏死因子等细胞因子在其中起重要的调节作用. 基于腹膜粘连形成的机制, 目前试用多种药物进行防治, 诸如抗炎药、促纤维蛋白溶解及抑制成纤维细胞增生药物、防腹膜粘连大分子物质、隔离物等, 并取得了一定疗效. 本文就腹膜粘连的研究现状及今后的发展方向作一综述.

曾健, 李晓辉. 腹膜粘连的分子机制及药物防治. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1429-1432

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1429.asp>

## 0 引言

腹膜粘连是长期困扰外科手术领域的一个重要问题. 剖腹术后粘连发生率达 90 % 以上<sup>[1]</sup>, 80 % 以上的病例在伤口和网膜之间形成粘连, 50 % 病例累及肠道<sup>[2]</sup>. 腹膜具有强大的再生能力, 虽然早期一定程度的腹膜粘连反应可使腹腔炎症局限, 有利于创伤的愈合, 但腹膜粘连可引起严重并发症, 包括肠梗阻、腹痛、女性不孕和盆腔痛<sup>[1]</sup>, 增加再手术的难度和手术并发症, 不但给患者造成极大痛苦, 也给社会带来负担, 因此预防腹膜粘连是外科领域非常关注的问题, 也是外科开腹手术急需解决的重大难题.

## 1 腹膜粘连的病理过程

腹膜损伤后引发修复反应, 最终形成如下结构: 表面有一层与正常腹膜表面相同的间皮细胞, 内部是由大量胶原纤维及部分弹性纤维组成的结缔组织, 其间分布着纤维母细胞及少量吞噬细胞, 并有毛细血管长入其中. 尽管这种血管能为其提供养分, 但缺乏真正的内膜结构, 而不同于正常血管. 动物实验证实: 腹腔粘连的形成过程有以下几步: (1) 纤维蛋白胶状基质形成. 腹膜

损伤后, 机体反应涉及凝血、激肽、纤溶及花生四烯酸代谢四大系统, 使机体很快进入临界凝血状态, 存在于血液及腹膜内的纤维蛋白原分泌于创面, 在凝血酶的作用下, 其相互作用形成可溶性聚合物. 这些聚合物在腹腔内停留足够的时间, 与一些凝血因子充分接触后, 成为不溶性聚合物, 最后再与较大分子蛋白相连接, 形成纤维蛋白胶状基质. 这一过程发生于伤后 3 h 内. 此胶状物位于两受损腹膜面间, 形成粘连雏形. (2) 伤后 1-3 d 纤维蛋白基质逐渐被包含有纤维母细胞、巨噬细胞的血管颗粒组织所取代. 此时, 粘连表面尚无间皮细胞出现. (3) 第 4 d 大部分纤维蛋白消失, 呈现出大量的纤维母细胞及与之相关的胶原纤维, 并见不少巨噬细胞. (4) 第 5 d 纤维蛋白网逐渐形成, 其间可见明显的胶原纤维束、纤维母细胞及一些乳突细胞. 另外, 可见具有内皮细胞的小血管系统. (5) 5-10 d 纤维母细胞逐渐排列规整, 胶原纤维沉积增多. 2 wk 后细胞成分明显减少, 且主要是纤维母细胞. 最后, 腹膜损伤部位被间皮细胞覆盖, 形成纤维性粘连.

## 2 腹膜粘连发生的分子机制

Menzies<sup>[3]</sup>提出, 机械性损伤、组织缺血、异物刺激及腹膜炎等导致的浆膜损伤是腹膜粘连的主要诱因. 生理状态下, 腹膜纤维蛋白胶状物的形成和溶解处于动态平衡状态, 凝固的纤维蛋白能在 72-96 h 内被纤溶酶溶解. 腹膜损伤、缺血、炎症均能使纤溶活性降低, 这是腹膜粘连形成最主要的原因. 腹膜损伤早期, 毛细血管通透性增高, 血液中纤维蛋白、纤维连接蛋白渗出, 血小板、淋巴细胞、中性粒细胞<sup>[4]</sup>游出, 同时组织缺氧、局部异物刺激等激活单核巨噬细胞、肥大细胞、成纤维细胞、血小板, 产生并释放大量的生物活性物质如前列腺素、白三烯、氧自由基、细胞因子、5 羟色胺、组织胺及激肽释放酶, 进而促进纤维母细胞的增生、胶原的合成、纤维蛋白胶状物的沉积. 纤维蛋白胶状物是以胶原-纤维连接蛋白-蛋白多糖复合物的形式存在. 纤溶酶可将纤维蛋白和纤维蛋白原降解为纤维蛋白降解产物(FDP), 从而阻碍细胞外基质中纤维胶状物的形成. 组织中的纤溶酶是以酶原形式存在的, 纤溶系统的活性有赖于纤维蛋白酶原激活剂(t-PA)的活性, t-PA 可被体内的纤溶酶原激活剂抑制物(PAI)所拮抗. 通常认为, 腹膜损伤早期(72 h 内), t-PA 降低和 PAI 浓度增高<sup>[5]</sup>导致大量的基质纤维胶状物不能被分解而永久性沉积下来, 形成粘连. Hellebrekers et al<sup>[6]</sup>研究认为,

腹膜损伤后, t-PA 含量在创伤后 4 h 最低, 以后逐渐增高, 24-72 h 增高至正常或稍高水平, 而局部纤维蛋白合成量明显增多, 因而导致沉积. 1 wk 后大部分纤维蛋白消失, 呈现大量的纤维母细胞及胶原纤维, 形成纤维性粘连. 另外, 影响粘连形成的因子尚有细胞外基质中的金属蛋白酶, 因其可以降解 I - III、VII 型胶原及纤维结合蛋白. 基质金属蛋白酶(MMP-1)与基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1)作用相反, 二者受多种细胞因子及激素的调节, 与创伤愈合结局关系密切<sup>[7]</sup>. 目前对腹膜粘连相关细胞因子的研究比较深入, 现选择三种主要的细胞因子分述如下:

**2.1 转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )** TGF- $\beta$  是启动和终止组织修复的一种主要细胞因子, 是细胞生长的双向调节剂<sup>[8]</sup>, 在腹膜粘连过程中有重要作用. TGF- $\beta$  来源于人胚胎、血小板、单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等, 他能向临近细胞发出信号, 调节损伤组织重建的全过程. 哺乳动物中 TGF- $\beta$  有三种类型, 即 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_2$ 、TGF- $\beta_3$ , 不同的器官表达不同的 TGF- $\beta$ , 表达量与粘连形成有关<sup>[9]</sup>, 腹腔器官、浆膜组织及粘连部位表达 TGF- $\beta_1$ 、TGF- $\beta_3$  增多, 其中 TGF- $\beta_1$  在组织损伤中效应最强. 另外, 在缺氧条件下间质细胞表达 TGF- $\beta_1$  增高, 导致 III / II 型胶原比率增大<sup>[10]</sup>. TGF- $\beta$  通过与靶细胞受体结合发挥其效应, 他至少有 I、II、III 三种受体, 所有细胞均有表达. I、II 型受体为跨膜的丝 - 苏氨酸激酶, 完成细胞间的信号识别, 参与介导 TGF- $\beta$  对细胞外基质的合成与沉积, 调节细胞生长增生; III 型受体主要将 TGF- $\beta$  呈交给另外两种受体并调控细胞黏附蛋白和脂肪的形成. TGF- $\beta$  能促进细胞外基质中各种成分如胶原蛋白、纤维连接蛋白和蛋白多糖的表达, 抑制其降解, 刺激结缔组织的形成. 在腹膜粘连过程中, TGF- $\beta$  可能在损伤、炎症及纤维化之间起桥梁作用: 腹膜损伤后血小板和巨噬细胞释放 TGF- $\beta$ , 启动一个连锁反应, 破坏了纤维蛋白溶解与合成的平衡, 同时还导致细胞外基质的沉积, 从而促进了腹膜粘连的形成. 有实验报道<sup>[11]</sup>人腹膜间皮细胞加入人重组 TGF- $\beta_1$  体外培养 24 h, 测定 t-PA 和 u-PA、PAI-1 和 PAI-2 的 mRNA 及其蛋白含量, 结果: t-PA mRNA 和蛋白含量是对照组的 50 % ( $P=0.001$ ), PAI-1 mRNA 及其蛋白较对照组成倍增长, u-PA 基因表达增高, 但蛋白含量没有增高, PAI-2 没有变化, 表明 TGF- $\beta_1$  可抑制组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)的活性, 增强组织型纤溶酶原抑制剂活性.

**2.2 血管内皮生长因子(VEGF)** VEGF 又名血管通透因子(VPF), 是 1989 年发现的一种血管生成因子, 是由 2 个相同多肽链通过二硫键构成的同源二聚体糖蛋白, 其基因由 8 个外显子及 7 个内含子组成, 全长 14kb. 其生物学功能主要有: (1)促进内皮细胞的增生. (2)增加血管的通透性和维持血管的功能. (3)血管生成功能. 增加血管通透性的作用部位主要在毛细血管后静脉和小静脉.

最初认为 VEGF 是通过增加内皮细胞间隙来实现的, 目前认为在小静脉内皮细胞的细胞质中有一些由若干囊液泡组成的葡萄簇样结构的小囊液泡器, 通过免疫细胞化学发现血管内皮细胞的基底膜面和小囊液泡器中有结合的 VEGF. 局部注射 VEGF 后可观察到小囊液泡器功能增强, 提示 VEGF 可能通过对小囊液泡器之间窗口开启的调节而促使血管通透性增加. Murohara et al<sup>[12]</sup>认为 VEGF 通过刺激 NO 和前列腺素的释放而增加血管通透性, VEGF 增加血管通透性的作用十分强烈, 其效应是组胺作用浓度的 5 万倍. VEGF 抗体可拮抗 VEGF 的强烈血管通透作用, 从而抑制纤维蛋白原渗出、沉积, 达到预防粘连的作用.

**2.3 肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )** TNF- $\alpha$  属于介导炎症的细胞因子, 在体外能促进成纤维细胞的增生, 激活中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、内皮细胞, 在体内炎症前期有一定的介导作用, 同时也是炎症反应中激活细胞因子级连反应的主要递质. 在炎症腹膜中, TNF- $\alpha$  的合成和释放, 成为产生纤维性粘连的基础<sup>[13]</sup>. TNF- $\alpha$  能使腹膜间皮细胞增加 I 型纤溶酶原激活剂抑制剂(PAI-1)的生成<sup>[14]</sup>. 实验<sup>[15]</sup>表明术后 TNF- $\alpha$  含量与粘连形成呈线性正相关.

### 3 腹膜粘连的药物防治

腹膜粘连形成机制的复杂性提供了各种药物干预的机会. 近年来药物治疗取得了新的进展.

**3.1 抗炎药** 通过抗炎症反应, 减少纤维蛋白渗出, 防止腹膜粘连形成. 有研究证明 5-羟色胺受体拮抗剂有减少粘连的作用<sup>[16]</sup>. 激素类药虽有抗炎作用, 但其抑制免疫, 影响伤口愈合, 较少应用. 非甾体抗炎药(如布洛芬、消炎痛、阿司匹林等), 是通过影响环氧合酶活性而改变花生四烯酸代谢, 抑制其终产物(包括前列腺素和血栓素)的形成, 以调节炎症过程, 预防粘连形成的动物实验<sup>[17,18]</sup>已多次证明大量静脉用药可减少腹腔粘连的形成. 色甘酸二钠是肥大细胞膜的稳定剂, 减少肥大细胞脱颗粒, 动物实验<sup>[19]</sup>表明其可使腹膜粘连减轻. Dai-Kenchu-to 可抑制 COX-2 活性<sup>[20]</sup>, 防止术后肠粘连和炎症反应. 氧自由基清除剂及钙通道阻滞剂亦可减轻局部炎症而预防粘连形成, Galili et al<sup>[21]</sup>最近用美蓝腹腔给药能明显减少手术后腹膜粘连的形成, 机制是干扰自由基的产生, 减少红细胞膜损伤.

**3.2 促纤维蛋白溶解、抑制成纤维细胞增生药物** (1)纤维蛋白沉积是粘连形成的关键环节, 预防和去除纤维蛋白的药物在理论上可以防止粘连的形成, 但其有引起伤口愈合不良或出血的危险: (a)全身或腹腔内应用链激酶、尿激酶、弹性蛋白酶. (b)应用组织纤维蛋白溶解酶原激活物防止粘连及使用  $\alpha$ -球蛋白增强巨噬细胞吞噬渗出的纤维蛋白的功能. (c)抑肽酶为非特异性纤溶剂, 作用机制可能是调节腹膜修复中的一些递质和纤维蛋白溶解作用, Ozogul et al<sup>[22]</sup>研究认为抑肽酶在

腹膜损伤早期抑制白细胞功能相关抗原(LFA), 通过抑制纤溶酶及转化生长因子 $\beta$ 的活性防止粘连形成. (2)防止纤维蛋白的沉积: (a)腹腔应用枸橼酸钠、肝素或其他抗凝剂来预防手术后腹腔内纤维蛋白沉积形成粘连. 机制: 促进纤溶酶原激活物的活性, 从而增强纤维蛋白溶解作用; 刺激巨噬细胞分泌纤维蛋白溶解酶原激活物. (b)灌注奥曲肽: 是生长抑素的一种合成类似物, 可抑制T细胞对组织损伤的反应, 减少胶原的合成, 防止胶原纤维沉积形成粘连<sup>[23]</sup>. (c)含RGD片段的多肽: 含3-7个氨基酸的多肽均具有防粘连作用, 但以7肽作用最为显著<sup>[24]</sup>, 机制是通过阻止整合素与相应受体结合, 从而阻止纤维连接蛋白与纤维蛋白结合, 阻止纤维蛋白沉积, 并可阻止血小板聚集与激活, 阻止白细胞渗出, 最终防止粘连形成. (d)纤维蛋白密封胶<sup>[25]</sup>在腹膜创伤后防止纤维组织的沉积, 防止粘连的形成. (e)丹参注射液对体外培养的成纤维细胞的增生和分泌有抑制作用, 丹参可使粗面内质网变性, 使细胞合成胶原蛋白减少. (3)抑制成纤维细胞增生: 激素类药物可抑制成纤维组织的增生, 氯氟舒软膏局部涂擦腹膜受损创面的动物实验<sup>[26]</sup>表明其可降低严重的腹膜粘连, 但激素易致吻合口不愈合及腹腔脓肿. 5-氟尿嘧啶也有相似作用及副作用.

3.3 某些防腹膜粘连的大分子物质 (1)卵磷脂: 存在于机体细胞膜及腹腔液中. 外源性卵磷脂可在腹膜损伤处形成一层光滑薄膜, 可阻止两创面对合, 同时增加小肠的活动性. 这样可减少纤维蛋白在两个浆膜面间的沉着而预防粘连形成. Muller et al<sup>[27]</sup>实验研究表明磷脂可减轻粘连的形成, 不影响损伤部位的胶原合成, 不影响创伤的愈合. 脂肪乳剂及聚乙烯吡咯烷酮(PVP)有类似作用. (2)甘油等组成的泡沫状物: 一种由甘油、丙二醇、硬脂酸甘油酯及硅酮油组成的泡沫状混合物, 腹腔给药后, 可通过阻止纤溶酶原激活剂由创面移走而防止粘连形成, 还可阻止细菌、真菌及酸碱化学物质进入腹膜创面. 其确切机制及临床价值有待进一步研究. (3)右旋糖酐: 是一种来源于发酵过程可溶于水的多糖类. 作用机制: 水化漂浮和硅化作用分隔腹膜面、稀释局部纤维蛋白的浓度、保护局部纤维蛋白溶解酶原激活剂及干扰多形核白细胞表达黏附分子等. 但临床妇科研究未能证明其抗粘连作用, 并因其可引起腹水、凝血功能障碍及过敏反应等限制临床应用<sup>[28]</sup>. (4)透明质酸(HA): 一种新型的防止术后组织粘连的高分子可吸收生物医学材料<sup>[29]</sup>, 是一种高分子量直链多糖, 有特殊的物理化学和流变学特性以及生物学作用, 同时又是生物可降解性高分子, 具有良好的生物相容性, 对防止术后组织粘连有良好效果. 透明质酸钠可减少淋巴细胞浸润, 抑制细胞的迁移, 限制血纤维蛋白原的扩散, 抑制超氧化物从PMN中释放<sup>[30]</sup>, 有效防止腹膜粘连, 在腹部外科手术临床应用中有良好效果. (5)半固态胶状物: 泊洛沙姆(poloxamer 407)与N, O-羧甲基己丁糖(NOCO): 均具有

较好的组织相容性, 可于创面形成胶状物, 实验证明均有可靠的防粘连效果, 但机制不清. (6)蜂蜜有适宜的湿度、低pH、高渗性的物理特性, 可促进损伤创面的愈合, 研究表明<sup>[31]</sup>蜂蜜在损伤表面形成高渗性保护机制, 抑制纤维蛋白酶原的活性.

3.4 隔离物 腹膜粘连形成关键在伤后的5-7 d. 若在腹膜损伤面间置入隔离物, 且保持1 wk, 受伤腹膜便可再上皮化, 最后无粘连愈合. (1)膨化聚四氟乙酸(EPTFE): 用于血管移植已数年, 因其非免疫原性, 近年用于预防粘连. 但其疏水性、组织黏附性差及非生物降解性, 使其必须缝合于损伤处成为永久性异物, 进而增加了缝合部位感染和粘连的机会. (2)氧化再生纤维素(ORC): ORC生物相容性良好, 能完全在体内降解, 滴到损伤部位后迅速形成胶状物并持续1 wk左右. 实验证明ORC可显著降低粘连的范围及程度, 但用前应彻底止血<sup>[32]</sup>. (3)羧甲基纤维素(CMC)是一种生物相容性良好, 能完全在体内降解, 无毒的液性生物材料, 经动物实验证实, 抗粘连作用明显, 用于腹腔1 d后形成胶冻样物质, 可保护受损组织再上皮化至5 d左右, 之后自体内清除. 透明质酸羧甲基纤维素(HA-CMC): 是HA与CMC结合而形成的新型可吸收生物膜, 具无毒、无免疫原性及生物相容性好等特点. 用于腹腔, 1 d后形成吸水性凝胶, 可保护组织再上皮化至第7 d, 28 d后自体内清除, 不需缝合. (4)聚乙烯醇侧链和苯基硼酸聚合体的主链部分与生物表面形成可逆的共价复合物, 比其静电结合生物效应更明显, 自然的覆盖创面, 保护这些表面不与其他蛋白或细胞进行交互作用, 4 h内阻挡细胞扩散, 24 h效应降低, 同时聚合物也能提高外科手术粘连溶解的疗效<sup>[33]</sup>. 聚乙烯醇水凝胶交联明胶经紫外线照射10 h, 在动物体内凝胶层3 d被降解, 紫外线照射时间越长, 降解时间越长<sup>[34]</sup>.

3.5 其他疗法 (1)通过应用血管内皮生长因子(VEGF)抗体, 拮抗VEGF的作用, 可减少组胺、激肽、花生四烯酸代谢产物, 改变血管通透性, 抑制纤维蛋白原沉积, 最终抑制粘连形成<sup>[35]</sup>. (2)抗转化生长因子- $\beta$ 抗体, 能明显减少纤维组织的细胞密度. (3)白介素10(IL-10)通过免疫调节减少术后粘连. (4)昔帕泛是血小板激活因子的拮抗药, 研究表明<sup>[36]</sup>其可减轻腹膜粘连, 且不影响创伤晚期羟脯氨酸含量, 即不影响创面愈合. (5)晶体液腹腔灌注可减轻粘连, 但晶体液吸收快, 500 ml晶体液在24 h内可被吸收干净, 而腹膜再上皮化需5-7 d. (6)胃动力促进剂: 新斯的明、西沙必利等. 避免肠管间、肠管与腹膜间长久固定接触, 减少粘连. 西沙必利(普瑞博思)可促进神经丛的内源性乙酰胆碱释放, 还可通过促进运动胆碱能神经影响激素的释放及直接与内分泌细胞相互作用, 主动增加胃肠动力. (7)针灸并音频离子导入、推拿正弦调制中频电流、穴位注射配合音频治疗以及大乘气汤、通腹泻热灌肠合剂等中药方剂预防术后腹膜粘连.

此外,改进外科技术也是防腹膜粘连的重要方面。其目的为减少组织损伤,减轻组织缺血缺氧性损害。只有改进外科手术技术才能有效减少不必要的术后粘连的发生率和死亡率。外科操作时应注意(1)缩短手术时间。(2)手术操作轻柔规范,勿伤肠管、脏器的浆膜,避免牵拉、触摸及电灼,保持浆膜湿润。(3)切勿缝合过紧,应用细而无组织反应的缝线。(4)减少异物进入腹腔(如滑石粉、线头、棉丝)。(5)腹腔清洗液用吸引器吸净,避免用纱布揩擦。(6)尽可能选择创伤小的外科手术方式(如腹腔镜手术)。(7)术后早期活动,促进肠蠕动恢复。

到目前为止,临床腹部外科手术术后腹膜粘连的防治仍是一个重大难题,尚无一种安全、有效、简便及可靠的防治粘连的措施。随着对术后腹膜粘连发病机制认识的逐渐深入,预防粘连会有更可靠的依据和方法。随着生物医学研究的发展,合成可降解、具有良好生物相容性的无毒、无副作用的液状高分子生物材料,做为隔离物将成为医学界研究的热点之一。单一隔离物并非十分理想,如能把隔离物与促纤维蛋白溶解、防止纤维蛋白沉积等药物联合应用,必将前景辉煌。相信在国内外医学工作者的共同努力下,随着对腹膜粘连机制的进一步阐明会有新的复合生物材料及生物制剂涌现,应用临床,造福人类。

#### 4 参考文献

- Liakakos T, Thomakos N, Fine PM, Dervenis C, Young RL. Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent advances in prevention and management. *Di Surg* 2001;18:260-273
- Menzies D, Ellis H. Intestinal obstruction from adhesions-how big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl* 1990;72:60-63
- Menzies D. Peritoneal adhesions. Incidence, cause, and prevention. *Surg Annu* 1992;24(Pt 1):27-45
- Vural B, Canturk NZ, Esen N, Solakoglu S, Canturk Z, Kirkali G, Sokmensuer C. The role of neutrophils in the formation of peritoneal adhesions. *Hum Reprod* 1999;14:49-54
- Scott-Coombes D, Whawell S, Vipond MN, Thompson J. Human intraperitoneal fibrinolytic response to elective surgery. *Br J Surg* 1995;82:414-417
- Hellebrekers BW, Trimbo-Kemper GC, Bakum EA, Trimbo JB, Declerck PJ, Kooistra T, Emeis JJ. Short-term effect of surgical trauma on rat peritoneal fibrinolytic activity and its role in adhesion formation. *Thromb Haemost* 2000;84:876-881
- Chegin N, Kotseos K, Bennett B, Diamond MP, Holmdahl L, Burns J. Matrix metalloproteinase (MMP-1) and tissue inhibitor of MMP in peritoneal fluids and sera and correlation with peritoneal adhesions. *Fertil Steril* 2001;76:1207-1211
- Herndon DN, Nguyen TT, Gilpin DA. Growth factors. Local and systemic. *Arch Surg* 1993;128:1227-1233
- Chegin N, Kotseos K, Zhao Y, Bennett B, Mclean FW, Diamond MP, Holmdahl L, Burns J. Differential expression of TGF-beta1 and TGF-beta3 in serosal tissues of human intraperitoneal organs and peritoneal adhesions. *Hum Reprod* 2001;16:1291-1300
- Saed GM, Zhang W, Chegin N, Holmdahl L, Diamond MP. Alteration of type I and III collagen expression in human peritoneal mesothelial cells in response to hypoxia and transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen* 1999;7: 504-510
- Falk P, Ma C, Chegin N, Holmdahl L. Differential regulation of mesothelial cell fibrinolysis by transforming growth factor beta 1. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:439-447
- Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998;97:99-107
- Whawell SA, Scott-Coombes DM, Vipond MN, Tebbutt SJ, Thompson JN. Tumor necrosis factor-mediated release of plasminogen activator inhibitor 1 by human peritoneal mesothelial cells. *Br J Surg* 1994;81:214-216
- van Hinsbergh VW, van den Berg EA, Fiers W, Dooijewaard G. Tumor necrosis factor induces the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blood* 1990;75:1991-1998
- 谢建兴, 赵江宁, 谭月红, 崔学教. 通腑泻热灌肠合剂对大鼠术后腹腔粘连及血 TNF- $\alpha$  水平的影响. *中国中西医结合外科杂志* 2001;7:254-256
- Langer JC, Liebman SM, Monk PK, Pelletier GJ. Mast cell mediators and peritoneal adhesion formation in the rat. *J Surg Res* 1995;59:344-348
- LeGrand EK, Rodgers KE, Girgis W, Campeau JD, Dizerega GS. Comparative efficacy of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and anti-thromboxane agents in a rabbit adhesion-prevention model. *J Invest Surg* 1995;8:187-194
- Golan A, Maymon R, Winograd I, Bukovsky I. Prevention of post-surgical adhesion formation using aspirin in a rodent model: a preliminary report. *Hum Reprod* 1995;10:1797-1800
- Canturk NZ, Vural B, Cubukcu A, Duzcen E, Utkan Z, Dulger M. Experimental study on the role of mast cells in peritoneal adhesion formation. *East Afr Med J* 1999;76:233-236
- Hayakawa T, Kase Y, Saito K, Hashimoto K, Ishige A, Komatsu Y, Sasaki H. Effects of Dai-kenchu-to on intestinal obstruction following laparotomy. *J Smooth Muscle Res* 1999;35:47-54
- Galili Y, Ben-Abraham R, Rabau M, Klausner J, Kluger Y. Reduction of surgery-induced peritoneal adhesions by methylene blue. *Am J Surg* 1998;175:30-32
- Ozogul Y, Baykal A, Onat D, Renda N, Sayek I. An experimental study of the effect of aprotinin on intestinal adhesion formation. *Am J Surg* 1998;175:137-141
- Lai HS, Chen Y. Effect of octreotide on postoperative intraperitoneal adhesions in rats. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:678-681
- Rodgers KE, Girgis W, Campeau J, diZerega GS. Reduction of adhesion formation by intraperitoneal administration of Arg-Gly-Asp-containing peptides. *Fertil Steril* 1998;70:1131-1138
- Jahoda AE, Albala DM, Dries DJ, Kovacs EJ. Fibrin sealant inhibits connective tissue deposition in a murine model of peritoneal adhesion formation. *Surgery* 1999;125:53-59
- Zhang YD, Yao W, Wu CX, Chi QM, Zhang JY, Li M. Tropical application of halcinonide cream reduces the severity and incidence of intraperitoneal adhesions in a rat model. *Am J Surg* 2002;184:74-77
- Muller SA, Treutner KH, Tietze L, Anurov M, Titkova S, Polivoda M, Oettinger AP, Schumpelick V. Efficacy of adhesion prevention and impact on wound healing of intraperitoneal phospholipids. *J Surg Res* 2001;96:68-74
- Risberg B. Adhesions: preventive strategies. *Eur J Surg Suppl* 1997;577:32-39
- Balazs EA, Leshchiner EA. Hylutonan, its cross-linked derivative-hylan and their medical applications in : Inagaki H, Phillips GO, eds. In cellulose utilization: research and rewards in cellulose. New York: Elsevier Appl Science, 1989:233-241
- Larsen NE. Management of adhesion formation and soft tissue augmentation with viscoelastics: hyaluronan derivatives. In: Laurent TC, ed. The chemistry, biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives. London: Portland Press, 1998:267-281
- Aysan E, Ayar E, Aren A, Cifter C. The role of intra-peritoneal honey administration in preventing post-operative peritoneal adhesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;104:152-155
- Dizerega GS. Contemporary adhesion prevention. *Fertil Steril* 1994;61:219-235
- Winblade ND, Schmokel H, Baumann M, Hoffman AS, Hubbell JA. Sterically blocking adhesion of cells to biological surfaces with a surface-active copolymer containing poly(ethylene glycol) and phenylboronic acid. *J Biomed Mater Res* 2002;59:618-631
- Matsuda S, Se N, Iwata H, Ikada Y. Evaluation of the antiadhesion potential of UV cross-linked gelatin films in a rat abdominal model. *Biomaterials* 2002;23:2901-2908
- 郑振华, 张桦, 潘玉先, 高毅, 杨继震. 应用 VEGF 抗体预防术后腹腔粘连的实验研究. *世界华人消化杂志* 1999; 7:227-229
- Ozgun H, Cevikel MH, Kozaci LD, Sakarya S. Lexipafant inhibits postsurgical adhesion formation. *J Surg Res* 2002;103:141-145



# 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展

姚学清, 林 锋

姚学清, 中国人民解放军第一军医大学南方医院普外科  
广东省广州市 510515  
林锋, 广东省人民医院胃肠外科 广东省广州市 510082  
项目负责人: 姚学清, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院普外科.  
电话: 020-61364623  
收稿日期: 2001-10-21 接受日期: 2001-11-27

## 摘要

目的: 综述进展期大肠癌多药耐药细胞株建立的进展.

方法: 回顾复习近年的文献, 了解多药耐药与大肠癌细胞株建立的情况, 并对大肠癌多药耐药细胞株建立的情况进行概括.

结果: 多药耐药(MDR)是大肠癌化疗失败的主要原因之一, 建立多药耐药细胞株, 为临床治疗大肠癌奠定的基础.

结论: 建立大肠癌耐药细胞株, 为临床克服化疗障碍, 提高大肠癌对化疗药物的敏感性, 对大肠癌治疗起到重要作用.

姚学清, 林锋. 肿瘤多药耐药和进展期大肠癌耐药细胞株建立研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1433-1435

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1433.asp>

## 0 引言

大肠癌是消化道常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率在消化道较高. 进展期大肠癌根治性效果差, 手术切除率只有 50 % 左右, 大部分进展期大肠癌术后发生腹腔内复发转移, 5 a 生存率只有 23-30 %. 近年腹腔热灌注化疗<sup>[1-3]</sup>引起国内外学者广泛的关注, 对术后腹腔内复发转移的防治具有一定的作用, 但多药耐药(multidrug resistance, MDR)是大肠癌化疗失败的主要原因之一, 关于 MDR 机制的研究及如何克服 MDR 的问题, 受到国内外广大学者的高度重视, 体外耐药细胞株的建立是研究肿瘤细胞耐药不可缺少的模型, 国内外就耐药机制的研究已建立许多种耐药细胞株, 并以耐药细胞株的建立而筛选 MDR 逆转剂, 为临床克服化疗障碍, 提高大肠癌对化疗药物的敏感性, 对大肠癌治疗起到重要作用. 本文就 MDR 发生机制及建立大肠癌耐药细胞株和建株注意问题进行综述.

## 1 MDR 发生机制和 MDR 逆转

MDR 是肿瘤细胞在接触了一种抗癌药物后产生的对其他多种结构与功能迥异的天然药物的耐药<sup>[4,7]</sup>, MDR 是肿瘤化疗主要障碍之一, 与之相关的是 Pgp, 在 Pgp

方面的研究逐渐增多, Pgp 来自肿瘤细胞, 作为一种独立的能量流出泵(也称ATP流出药泵)导致化疗药物药性降低, MDR<sub>1</sub> (multidrug resistance gene)及其产物 Pgp 能够将化疗药物从肿瘤细胞中泵出, 减少抗肿瘤药物在细胞中聚集. 产生MDR机制很多, 其中主要有以下几方面: (1) MDR<sub>1</sub> (multidrug resistance gene)基因产物Pgp过度表达; (2)MDR相关蛋白(multidrug resistance-associated protein)过度表达<sup>[5]</sup>; (3)LRP (lung resistance protein)介导MDR, 使化疗药物在肿瘤细胞聚集降低; (4)拓扑异构酶 II (ToPo II)活性降低; (5)谷胱甘肽-S- 转移酶(glutathione S transferase, GST)活性增强; (6)蛋白激酶C(PKC)与MDR表型相关; (7)癌基因 c-myc、C-myc 表达减少和 C-fos、C-jun 表达增加<sup>[6]</sup>. 从以上 MDR 机制可以看出, MDR 包含非常复杂机制, 目前有些机制尚未明了. 在 MDR 方面 MDR<sub>1</sub>mRNA 和 Pgp 可能是重要目标. Musto et al<sup>[8]</sup>研究发现, 人 TNF 和 IL-2 在 MCT15 和 MCT116 人结肠癌细胞系转导和表达, 可以逆转 MDR, TNF 和 IL-2 部分减少 mRNA 和 Pgp 水平上 MDR<sub>1</sub> 表达(P < 0.243). 几种类似方法可以影响 Pgp 活性, 应用钙通道阻断剂、钙调蛋白等, 或应用各种细胞分裂调节 MDR<sub>1</sub> 基因表达, 并且 MDR 基因表达应视作先天性表达, 说明 MDR<sub>1</sub> 基因表达大部贯穿于肿瘤中, 这对肿瘤化疗起着关键作用. 有关 MDR<sub>1</sub> 基因及其表型的研究基本清楚, MDR<sub>1</sub> 基因克隆及其基因表达已用于临床. 根据 MDR 发生机制, 可以采取以下几种方法来逆转MDR: (1)应用钙通道抑制剂, 使肿瘤细胞内化疗药物聚集增加, 从而增加抗癌药效性; (2)利用单克隆抗体选择性抑制 MDR 细胞生长, 减少肿瘤细胞 MDR; (3)应用 MDR 细胞对某些药物和环境改变的高度敏感性使MDR逆转. 逆转剂的出现为逆转药物的研究提供了一定理论基础, 同时解决了一些实际问题. Weinstein et al<sup>[9]</sup> 认为 65-68 % 大肠癌最初是由 MDR<sub>1</sub> mRNA 和 Pgp 表达的. 最近有关报道, MRP 过度表达机制可能是非 Pgp 介导产生的, 这种 M<sub>r</sub> 190 000 的膜蛋白由 MRP 编码完成. Filipits et al<sup>[10]</sup> 认为首先是解决 MRP 在大肠的表达, 从而解决 MRP 耐药机制, 克服大肠癌化疗中, MRP 具有重要参考价值. 其次评估 MRP 作为其他临床参数, 包括患者的存活率. Versantvoort et al<sup>[11]</sup> 认为 MRP 引起 MDR 有两种模式. (1)MRP 具有运转谷胱甘肽-S- 偶合物和细胞毒性药物的双重作用, 药物运转的调节与谷胱甘肽-S- 偶合物运转的调节是密切相关的. (2)MRP 是一种谷胱甘肽-S- 偶合物运载体, 能够活化内源性潜在药物的运转蛋白, 细胞毒性药物由细胞内

的潜在药物转运蛋白转运,而MRP能与之形成膜相关复合物,MRP对谷胱甘肽-S-偶合物的运转将同样引起药物的一系列变化.总之MRP在某些实体瘤中已被证实作为另一种MRP基因可能参与替代MDR机制<sup>[12]</sup>.

## 2 耐药细胞株的现状

自1988年Broggini et al<sup>[13]</sup>建立结肠癌耐药细胞株以来,国内外一系列耐药细胞株相继建立.1989年Sommers et al<sup>[14]</sup>乳腺癌耐药细胞株建立,K562/A02<sup>[15]</sup>、SGC7901/VCR、SGC7901/ADM、SGC7901/5-FU、SGC7901/MTX<sup>[16]</sup>等耐药细胞株相继建立,为研究MDR机制和MDR逆转,提高肿瘤细胞对化疗药物敏感性,从而为临床肿瘤的治疗提供了逆转耐药模型,以指导临床医生选择合理的化疗方案.耐药细胞株的建立是选用接种8 h后处于对数生长期的亲代细胞,用一定的化疗药物浓度反复处理,待亲代细胞生长稳定后逐步增加药物浓度.开始2-3 wk增加一倍的剂量药物浓度,用有限稀释法克隆,长出克隆后再取出培养,6-10 mo后<sup>[17,18]</sup>建立耐药细胞株.但不同的药物浓度作用于不同的细胞系,以及不同药物作用方式下所产生的耐药性特征具有明显的差异.Yang et al<sup>[17]</sup>应用2种方法诱导人结肠癌多药耐药细胞株Adr1.2和SRA1.2,是由人结肠癌细胞系Lovo培养建株,Adr1.2是由不同浓度的阿霉素长期连续处理诱导建株,SRA1.2是由阿霉素间断处理而诱导建株,这两个耐药细胞株具有交叉耐药和相似光谱细胞性因素,但Adr1.2在9种化疗药物实验中,阿霉素耐药性最强,SRA1.2对长春新碱耐药性最强,尽管SRA1.2具有Lovo细胞相似的生物学特性,而Adr1.2可以显著改变其生物学特性.另外,SRA1.2在无药条件下可以维持10 mo耐药性,进一步研究表明,Adr1.2和SRA1.2作为2种不同的耐药模型,为研究人结肠癌MDR提供了一种理想模型.Cohen et al<sup>[19]</sup>所建立HT-29/ADM耐药细胞株,在这个体系中,治疗前亚毒性剂量ADM作用于人结肠癌HT-29细胞,并在无药培养基中培养24 h,然后用ADM 0.3  $\mu\text{g/mL}$ 作用于HT-29细胞1 h,在这段时间细胞的存活能力和没有治疗的肿瘤细胞相比,治疗前细胞存活能力增加100倍,增加ADM剂量(2-8  $\mu\text{g/mL}$ )后,增加细胞的存活率,这种结果表明,具有一小部分抗ADM细胞产生抗ADM表型.类似的诱导耐药性观察到75%亚克隆细胞是从有限稀释HT-29细胞中分离出来,提示亲代细胞HT-29可以产生ADM表型,说明耐药机制的复杂性.总之,耐药细胞株的建立为寻求逆转人类肿瘤耐药新型化疗的增敏剂或综合化疗提供了实验模型.

## 3 MDR的临床意义

MDR产生的主要原因是过度表达的Pgp使大肠癌细胞内药物外流增加,故任何降低其外流的物质可使细胞内药物聚集增加,从而有效杀伤大肠癌细胞<sup>[20]</sup>.应用灵

敏的试验方法,Vitols发现大肠癌RNA表达水平低于正常组织,其他显示肾脏附近组织和肾脏具有较高的MDR<sub>1</sub>mRNA表达水平,而在肺脏、肝脏、空肠和结肠是中间表达水平,其他组织是低表达水平<sup>[21-25]</sup>.在肾脏附近、肾脏、肝脏和结肠肿瘤中有较高标准的MDR<sub>1</sub>mRNA<sup>[26]</sup>,MDR<sub>1</sub>基因过度表达是产生MDR的主要原因.Walther et al<sup>[27]</sup>研究发现TNF和IL-2可以调节MDR<sub>1</sub>表达和增加某一MDR<sub>1</sub>药物在肿瘤细胞系毒性.

MDR临床价值,决定大肠癌的患者MRP的临床价值,Filipits et al<sup>[10]</sup>应用RT/PCR及免疫组化的方法研究了MRP表达、MRP表现型,观察了88%大肠癌标本,单克隆抗体QCRL-1和QCRL-3在所有标本中占23%强阳性,77%弱阳性,对于年龄及性别无明显差别.早期结肠癌中瘤体大小、级别及远处淋巴结转移,强阳性的MRP表达与MDR<sub>1</sub>RNA或Pgp蛋白无关,与临床大肠癌存活率有明显的差异.辩认MDR生物学机制可以改善临床大肠癌治疗<sup>[28]</sup>,美国癌症防治研究所应用60株细胞株作为新的因子,以PCR技术设计MDR<sub>1</sub>/Pgp的表达,在39株细胞中检出MDR表达基准,尤其在肾癌和结肠癌有很高表达水平.一般来说,由Pgp含量较高的组织发生肿瘤,其MDR<sub>1</sub>/Pgp表达水平也较高,而未经治疗的肺癌、乳癌、食管癌等Pgp表达阴性,说明由MDR<sub>1</sub>过度表达组织癌变时,其MDR<sub>1</sub>基因也表达<sup>[29-32]</sup>.在大肠癌的治疗过程中,MDR给临床化疗带来许多困难,国内外学者对MDR作了大量的研究工作,近年来,由于使用了更有效的化疗药物,同时制订了更完备的联合化疗方案,使大肠癌患者化疗的疗效得到了稳定的提高,在临床很多患者经过最初的化疗后,最终产生MDR,从而使临床化疗失败,但如何解决MDR方面的诸多问题,还处于探索阶段.

MDR是耐药的重要形式,大肠癌的MDR是一种复杂现象,可能包括MRP基因和MDR1基因,MDR是大肠癌化疗失败的主要原因,MDR的表达水平与大肠癌细胞对化疗药物的耐受性相关,所以,通过对MDR的发生机制的研究,以反映大肠癌患者对药物敏感程度,以指导临床医生选择合理的化疗方案.MDR作为一种Pgp过度表达,是临床医生在大肠癌的化疗遇到的技术难关.

## 4 建立耐药细胞株注意事项

4.1 材料准备 目前,临床建立许多种耐药细胞株,选择亲代细胞和药物应与临床应用具有相关性,试剂和溶液配制严格科学性和严密性.

4.2 建株方法选择 耐药细胞株建立一般分2种方法<sup>[17]</sup>,一是逐步增加药物浓度的方法作用于亲代细胞,培养建株;二是间断大剂量浓度药物作用于亲代细胞建株.无论是持续或间断诱导都应以与临床周期性化疗相配套,所建立的耐药细胞株更好模拟化疗后患者出现耐药情况,更适合研究MDR模型.

4.3 结果判定 临床建立耐药细胞株<sup>[13-19]</sup>,采用细胞形

态学、超微结构观察、细胞生长曲线测定、IC<sub>50</sub> (the 50 % inhibition concentration)测定、染色体核型分析法等, Yang et al<sup>[17]</sup>应用基因扩增仪测定所建立的耐药细胞系 MDR<sub>1</sub>, 从分子水平上探讨 MDR 机制, 从而为临床MDR逆转及化疗增敏剂应用提供更加理想的实验基础。

总之, 耐药细胞株的建立, 为临床研究MDR机制提供良好模型, 为耐药逆转剂研究提供了一定的途径, 但如何把耐药细胞株建立更好与临床肿瘤化疗产生的MDR有机结合起来, 探讨其MDR机制还有待于进一步完善。对耐药细胞株的各项检测方法有待于进一步研究。大量的体外耐药细胞株建立, 为进行有效的临床化疗耐药机制试验作了准备。各种耐药逆转剂发现, 可以提高肿瘤细胞内药物浓度, 但无论是何种耐药逆转剂, 对肿瘤细胞内药物浓度只是部分逆转, 提示我们有必要筛选更有效的逆转药物。随着高效逆转剂的不断发现, 并逐步应用于临床, 各种耐药细胞株的建立, 肿瘤化疗的耐药性将被克服。

## 5 参考文献

- Furukawa T, Cuelife JS, Spartt WJ. A clinical pilot study combining surgery with intraoperative pelvic hypothermic chemotherapy to prevent the colon recurrence of rectal cancer. *Anticancer Res* 1993;13:287-291
- Mori M, Mimori K, Ueo H, Karimine N, Barnard GF, Sugimachi K, Akigoshi T. Molecular detection of circulating solid carcinoma cell in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996;68:739-743
- 卿三华, 周锡庚, 周正端, 齐德林, 姚明, 梁立德. 大剂量大容积 5-氟尿嘧啶腹腔化疗治疗结直肠癌的实验和临床研究. *中华肿瘤杂志* 1996;18:92-95
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. Characterization of the M<sub>r</sub>190 000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res* 1995;55:102-110
- Peters PJ, Geuze HJ, van der Donk HA, Borst J. A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Today* 1990;11:28-32
- Gewirtz DA. Does bulk damage to DNA explain the cytostatic and cytotoxic effects of Topoisomerase II inhibition? *Biochem Pharmacol* 1991;42:2253-2258
- Sela S, Husain SR, Pearson JW, Longo DL, Rahman A. Reversal of multidrug resistance in human colon cancer cells expressing the human MDR1 gene by liposomes in combination with monoclonal antibody or verapamil. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:123-128
- Musto P, Melillo L, Lombardi G, Matera R, di Giorgio G, Carotenuto M. High risk of early relapse for leukaemic patients with presence of multidrug resistance associated P-glycoprotein positive cells in complete remission. *Br J Haematol* 1991;22:50-53
- Weinstein RS, Jakate SM, Dominguez JM, Lebovitz MD, Koucis SK, Koukoulis GK, Kuszak JR, Klusensl F, Grogan TM, Saclarides TJ, Roninson IB, Coon JS, Dominguez JM. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991;51:2720-2726
- Filipits M, Suchomel RW, Dekan G, Stiglbauer W, Haider W, Depisch D, Pirker R. Expression of the multidrug resistance-associated protein gene in colorectal carcinomas. *Brit J Cancer* 1997;75:208-213
- Versantvoort CH, Broxtermun HJ, Bagri T, Schepers RJ, Twentyman PR. Regulation by glutathione of drug transport in multidrug-resistant human lung tumour cell lines overexpressing multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer* 1995;72:82-89
- Chuman Y, Sumizawa T, Takebayashi Y, Niwa K, Yamada K, Haraguchi M, Furukawa T, Akiyama S, Aikou T. Expression of the multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene in human colorectal, gastric and non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer* 1996;66:274-279
- Broggini M, Grand M, Ubezio P, Geroni C, Giuliani FC, D'Incalci M. Intracellular doxorubicin concentrations and drug-induced DNA damage in a human colon adenocarcinoma cell line and in a drug-resistant subline. *Biochem Pharmacol* 1988;37:4423-4431
- Sommers CL, Walker-Jones D, Heckford SE, Worland P, Valverius E, Clark R, McCormick F, Stampfer M, Abularach S, Gelmann EP. Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1989;49:4258-4263
- 栾凤君, 杨纯正, 马建国, 刘瑞林, 齐静. 一株人红细胞多药耐药细胞系(K<sub>562</sub>/A<sub>02</sub>)的建立及其耐药特性的研究. *中华肿瘤杂志* 1993;15:101-103
- 蔡学君, 张学庸, 樊代明. 胃癌耐药细胞株耐药谱的体外实验. *第四军医大学学报* 1994;15:86-88
- Yang LY, Trujillo JM. Biological characterization of multidrug-resistant human colon carcinoma sublines induced/selected by two methods. *Cancer Res* 1990;50:3218-3225
- Iwahashi T, Okochi E, Ariyoshi K, Watabe H, Amann E, Mori S, Tsuruo T, Ono K. Specific targeting and killing activities of anti-glycoprotein monoclonal antibody MRK16 directed against intrinsically multidrug-resistant human colorectal carcinoma cell lines in the nude mouse model. *Cancer Res* 1993;53:5475-5482
- Cohen AM, Tremittara S, Candela F, Thaler HT, Sigurdson ER. Prognosis of node positive colon cancer. *Cancer* 1991;67:1859-1861
- 敖朝晖, 卢圣栋. 现代分子生物学技术. 北京: 高等教育出版社, 1993:408
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplak DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:265-269
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. Characterization of the M<sub>r</sub>190 000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res* 1995;55:102-110
- Broxterman HJ, Feller N, Kuiper CM, Bover E, Versantvoort CH, Teerlink T, Pinedo HM, Lankelma J. Correlation between functional and molecular analysis of mdrl P-glycoprotein in human solid-tumor xenografts. *Int J Cancer* 1995;61:880-886
- Chan HS, Grogan TM, DeBoer G, Haddad G, Gallie BL, Ling V. Diagnosis and reversal of multidrug resistance in paediatric cancers. *Eur J Cancer* 1996;32A:1051-1056
- Xie XY, Robb D, Chow S, Hedley DW. Discordant P-glycoprotein antigen expression and transport function in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1995;9:1882-1887
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Laisl-Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM. Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:116-124
- Walther W, Stein U, Pfell D. Gene transfer of human TNF alpha into glioblastoma cells permits modulation of mdrl expression and potentiation of chemosensitivity. *Int J Cancer* 1995;61:832-839
- Alvarez M, Paul K, Monks A, Hose C, Lee JS, Weinstein J, Graver M, Bates S, Fojo T. Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdrl<sup>1</sup>/p-Glycoprotein in the cell lines of the national cancer institute anticancer drug screen. *J Clin Invest* 1995;95:2205-2214
- Cordon C, Cordon C, O'bocchia J. Expression of the multidrug gene product P-glycoprotein in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cyto* 1990;38:1277-1281
- Germann UA. P-glycoprotein: a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer* 1996;32A:927-944
- Ford JM. Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers. *Eur J Cancer* 1996;32A:1001
- Charpin C, Vielh P, Duffaud F, Devictor B, Andracs L, Lavaut MN, Allasia C, Horschowski N, Piana L. Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: correlation to messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1539-1545

# 肽转运载体的分子特征

韩 飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽

韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽, 江南大学食品学院江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏省无锡市 214036  
中央级科研院所基础性工作专项资金项目 - 重点项目, No. 2100DEA 20022  
项目负责人: 乐国伟, 214036, 江苏省无锡市惠河路 170 号, 江南大学食品学院江南大学工业生物技术教育部重点实验室. lgw@sytu.edu.cn  
电话: 0510-5869236 传真: 0510-5869236  
收稿日期: 2003-05-18 接受日期: 2003-06-06

## 摘要

动物体内的肽转运载体主要有两种, PepT1 和 PepT2. PepT1 主要是肠肽转运载体, PepT2 主要是肾脏肽转运载体. 肽载体的分子结构特征主要有: (1)有 12 个假想的穿膜区, 在 9 区和 10 区之间有一大的胞外环, 且所有穿膜区内的序列都高度保留, 胞外环上的序列保留的很少; (2)被编码的蛋白上有多个 N-糖基化和蛋白激酶的识别位点, 他们可能参与肽转运的调控; (3)PepT1 上的 His-57 和 PepT2 上的 His-87 是最关键的组氨酸残基, 他们可能是转运蛋白发挥吸收功能时最关键的结合位点; (4)不同动物肽转运蛋白的氨基酸范围在 707 到 729 之间, 且不同动物相同器官肽转运载体的同源性高(大约 80 %), 同种动物不同器官肽转运载体的同源性低(大约 50 %). 了解肽载体的分子特征和组织分布, 可以更好地理解肽吸收的分子机制并有利于今后肽类药物的研发.

韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽. 肽转运载体的分子特征. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1436-1442

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1436.asp>

## 0 引言

肌体能否从消化道将完整的小分子肽吸收入血是近年来蛋白质研究领域的热点之一. 肽若完整吸收, 需穿越两个膜屏障, 一是肠上皮细胞的刷状缘膜, 另一个是肠上皮细胞的基底膜. 现已知小肽能借助刷状缘膜上的肽转运载体 PepT1 进入肠上皮细胞, 这些进入肠上皮细胞的小分子肽有多少能免遭肽酶的水解并穿过基底膜进入血液循环, 目前还不清楚<sup>[1-5]</sup>. 本文仅对不同动物体内, 肽穿越第一膜屏障时需借助的肽转运载体的分子特征, 以及其他组织上肽转运载体的分布情况和分子特征作一综述.

## 1 人类, 兔子和大鼠的肽转运载体

1990 年代中期, 肽载体的分子结构逐渐明晰. 在 1994 年, 两个实验小组同时确定了兔子的寡肽转运载体 PepT1<sup>[6, 7]</sup>. 兔子 PepT1 的 cDNA 长度为 2.7 kb, 他编码的蛋白质由 707 个氨基酸残基组成. 氨基酸序列研究表

明 PepT1 是由 12 个穿膜区组成的膜蛋白. 该蛋白在 9 区和 10 区之间有一大的亲水环, 这一结构区别于以往报道的载体蛋白. 体外翻译的结果表明, 膜蛋白中的亲水环是与 N 相连的糖基化的靶点, 且位于细胞外. 该蛋白还有其他特征, 如其上有一蛋白激酶 C 的磷酸化位点和一依赖性 cAMP 的磷酸化位点<sup>[7]</sup>.

其他研究者克隆了人<sup>[8]</sup>和大鼠<sup>[9]</sup>的 PepT1. 人的 PepT1 (h PepT1) cDNA 长为 2.2 kb, 有一开放的阅读框, 编码由 708 个氨基酸组成的蛋白质<sup>[8]</sup>. 大鼠的 PepT1 cDNA 长为 2.9-3.0 kb, 有一开放的阅读框, 编码由 710 个氨基酸组成的蛋白质<sup>[9-12]</sup>.

尽管不同种类动物 PepT1 cDNA 的长度不同, 但是他们编码的蛋白质在结构上却非常相似<sup>[13]</sup>. 他们都有 12 个假想的穿膜区, 且在 9 区和 10 区之间有一长的亲水片段, 这也是这一组转运蛋白最显著的特征. 结构预测模型表明, 长的亲水环位于细胞膜的外侧, 包含有几个与 N 相连的糖基化位点. 膜内容纳所有的 12 个  $\alpha$ -螺旋, 且氨基端和羧基端都位于胞质一侧. 这些 PepT1 蛋白具有高度的同源性. 大鼠 PepT1 的氨基酸序列与兔子和人的 PepT1 氨基酸序列分别有 77 % 和 88 % 的同源性<sup>[9]</sup>. 兔子和人的 PepT1 有 81 % 的同源性<sup>[8]</sup>. 但这些转运蛋白的氨基酸序列与其他已知的转运蛋白没有强的同源性. 值得注意的是, 所有穿膜区内的序列都高度保留, 而胞外环上的序列却保留的很少. 转运蛋白在结构上的差别表明蛋白激酶 A 和 C 磷酸化位点的位置和数量可能有所不同. 但这些转运蛋白结构上的差异与其转运功能有何联系, 现在还不清楚.

另一种肽的转运载体, PepT2, 与 PepT1 在结构和功能上都有所不同<sup>[14-19]</sup>. 人的 PepT2 cDNA 的全长是 2.7 kb, 有一长为 2.2 kb 的开放阅读框<sup>[16]</sup>. 大鼠的 PepT2 cDNA 长为 3.9 kb<sup>[14]</sup>. 尽管这些 PepT2 cDNA 的长度不同, 但他们都编码由 729 个氨基酸组成的蛋白质<sup>[20]</sup>. PepT1 和 PepT2 的共同特征包括假想的 12 个穿膜区, 一个大的胞外环和几个依赖于磷酸化的蛋白激酶位点.

虽然 PepT1 和 PepT2 转运蛋白在结构上有如此多的相似性, 但他们仍属于两个不同的转运体系<sup>[13]</sup>. 同种动物的 PepT1 和 PepT2 相比, 其同源性低于不同动物相同转运体系之间的同源性. 例如, 人的 PepT2 与大鼠的 PepT2 转运蛋白的氨基酸有 83 % 的同源性, 而人的 PepT2 与人的 PepT1 转运蛋白仅有 50 % 的同源性. 而且, PepT2 蛋白比 PepT1 蛋白的分子量大.

被克隆的肽转运蛋白的转运活性通常是通过肽转运

蛋白的cDNA在非洲爪蛙卵母细胞(xenopus oocytes)或其他细胞体系中体外表达来研究的. 体外转运研究表明, 肽载体能广泛的吸收二肽和三肽, 这些二肽和三肽可由酸性, 碱性或疏水性氨基酸组成. 在不同的条件下肽载体的转运底物可能是带电荷的或是中性的. 在生理pH条件下, 中性底物比带电荷的底物更容易被肽转运载体转运. 且 PepT1 对中性底物的亲和性比对阳性底物的亲和性大. 若想转运阳性底物, pH 必须再高一些<sup>[21-23, 26]</sup>.

肽转运载体的转运特征之一是肽底物与质子耦联转运<sup>[24, 25, 27-29]</sup>. Brandsch et al<sup>[30]</sup>研究了 Gly-Ser 通过 Caco-2 (PepT1)和 SKPT 细胞系(PepT2)时, 胞外 pH 为 6.0 或 7.0 的情况下, 质子对 Gly-Ser 吸收的影响. 在 Caco-2 细胞里, 转运载体与 Gly-Ser 的亲合常数(Kt)在 pH6.0 时为  $1.0 \text{ mmol/L}^{-1}$ , 在 pH7.0 时是  $1.2 \text{ mM}$ . 而 Gly-Ser 的最大吸收速度( $V_{\max}$ ) 在 pH6.0 时为  $13.7 \pm 0.3 \text{ nmol } 10 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ 蛋白}$ , 在 pH7.0 时为  $5.8 \pm 0.3 \text{ nmol } 10 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ 蛋白}$ . 在 SKPT 细胞系里也获得了相似的结果. 可见, 在两种细胞系里, 质子仅影响了  $V_{\max}$ , 而对底物与转运载体的亲和性没有影响. Steel et al<sup>[31]</sup>的研究表明, 质子与肽之间存在一个耦联比例, 对中性, 酸性和碱性的二肽来说, 该比例分别为 1:1, 2:1, 和 1:1. 且 pH 在 5.5-6.0 的情况下, PepT1 优先转运中性和酸性底物.

影响转运蛋白结构的因子, 如转运蛋白在细胞膜上的位置, 底物与转运蛋白结合的特定位点等都影响转运蛋白的转运活性. 有报道表明, 转运蛋白的组氨酸残基中, hPepT1 上的 His-57 和 PepT2 上的 His-87 是最关键的组氨酸残基, 他们可能是转运蛋白在发挥吸收功能时最关键的结合位点<sup>[32-37]</sup>, 而大鼠 PepT1 上的必须组氨酸残基可能涉及到与  $\text{H}^+$  和底物  $\alpha$ -氨基的结合<sup>[23, 26, 39]</sup>.

蛋白激酶A和C可能参与了肽转运的调控. Muller et al<sup>[38]</sup>的研究表明, 表达 PepT1 的 Caco-2 细胞内, 增加 cAMP 的水平, 可以导致 Gly-Ser 的吸收下降 50 %. 锌是一种必需的微量元素, 他在许多蛋白的结构和功能方面发挥着重要作用, 如稳定酶的结构, 是酶活性位点的必需成分, 作为酶的调控因子等等. Daniel et al<sup>[40]</sup>认为, 锌对肽的转运有选择作用. 他们用硫酸锌培养刷状缘膜囊(BBMV), 在不改变底物扩散速率的情况下, 观察到 Gly-Gln 和 Leu-Tyr 的吸收增加. 而相同情况下锌对谷氨酰胺或葡萄糖通过 BBMV 却没有影响.

肽载体在不同组织的分布信息主要来自于对编码肽转运蛋白的mRNA的研究. 基本技术是用特定的作了放射性标记的 DNA 作为探针, 进行 Northern 杂交分析, 大多数研究报道采用的是全长 cDNA. 有人报道, 在兔子的小肠中发现有 2.9 kb 长的 mRNA, 在肝脏和肾脏里的量比较低, 而在大脑中量则更低<sup>[7, 41]</sup>. 在结肠, 骨骼肌, 心脏, 脾脏或肺中没有检测到 mRNA. 大鼠 PepT1 mRNA 长为 2.9-3.0 kb, 主要位于小肠<sup>[19, 12]</sup>. 在肾脏的

皮质发现有微量的 mRNA, 但在肝脏中未发现有 mRNA 的存在. Liang et al<sup>[8]</sup>报道, 人的 PepT1 mRNA 长为 3.3 kb, 主要出现在小肠和来自于 Caco-2 细胞系的肠道上皮细胞. 在肾脏, 胎盘, 肝脏和胰腺中也观察到了 PepT1 mRNA, 而在肌肉, 大脑和心脏中没有发现.

在大鼠肾脏髓质中发现一长约 4 kb 的 PepT2 mRNA, 而在肾脏皮质中的丰度较低. 在大脑, 肺和脾脏中也发现了这种 mRNA, 但在心脏, 肝脏和小肠中未检测到<sup>[14, 42, 43]</sup>. 在兔子的肾脏皮质, 以及大脑, 肺, 肝脏和心脏中发现一 4.8 kb 的 PepT2 mRNA<sup>[15]</sup>. 在人的肾脏和小肠中也检测到了 PepT2 mRNA<sup>[16]</sup>.

PepT1 mRNA 能够在小肠中全长表达, 在结肠中表达的丰度低的多<sup>[41]</sup>, 在胃和盲肠中未能检测到. 他在小肠中的表达仅限于上皮表面, 在较深的组织, 如肌黏膜或肌浆膜, 未检测到 PepT1 mRNA 的表达<sup>[7]</sup>. 沿着肠绒毛的轴线(crypt-villus axis), 发现 mRNA 的最大表达量位于腺窝汇合点(crypt-villus junction) 以上大约 100-200  $\mu\text{m}$  处. 在整个小肠腺窝的较低部到中部未检测到这种 mRNA 的存在.

Ogihara et al<sup>[44]</sup>首次研究了转运蛋白本身而不是他的 mRNA 的位置. 他们研制了一种抗 -PepT1 抗体, 并用他(通过免疫杂交技术)在大鼠体内寻找 PepT1 蛋白. 研究结果证实, 在整个小肠 PepT1 被严格地表达, 而在肠绒毛底部没有 PepT1. 并且 PepT1 对于特殊的有吸收能力的上皮细胞是专有的, 且主要位于细胞的刷状缘膜.

由以上可知, PepT1 和 PepT2 在不同的组织分布不同. PepT1 主要是肠肽转运载体, PepT2 主要是肾脏肽转运载体. 有趣的是, PepT1 在肾脏中也能检测到<sup>[42]</sup>. PepT1 存在于动物的小肠, 表明其在营养和医药领域上有重要的作用, 可以借助他吸收肠道中的小肽和类肽药物<sup>[45-51]</sup>. PepT2 在肾脏中也发挥着重要的作用, 通过他可以重吸收部分肽和类肽药物, 从而提高了某些类肽药物的有效性并保存了以肽形式存在的氮源<sup>[52-57]</sup>.

近来, 在大鼠的大脑中克隆出第三种肽的转运载体<sup>[58]</sup>, PHT1, 他编码由 572 个氨基酸组成的蛋白质, 该转运蛋白也有 12 个穿膜区, 且在胞外的亲水环上也有多个与 N 相连的糖基化位点和多个依赖性蛋白激酶 C 的磷酸化位点. 但 PHT1 是一个全新的肽转运载体, 因其能够转运小肽和组氨酸, 而以往的肽载体只能转运小肽而不能转运游离氨基酸. PHT1 能在大脑和眼睛中被表达, 而在肠道和肾脏中不能被表达. 且 PHT1 与 PepT1 和 PepT2 的同源性很低(小于 20 %), 其生理作用目前尚不清楚.

## 2 禽类的肽转运载体

鸡肠肽转运载体(cPepT1)的 cDNA 长为 2 914 bp, 编码 714 个氨基酸组成的蛋白质, 估计其分子大小为 79.3 kD, 等电点为 7.48<sup>[59]</sup>.

cPepT1 氨基端的前 15 个氨基酸残基与哺乳动物的



PepT1 完全不同(图1)。cPepT1 预测的氨基酸序列与兔子、人、小鼠、大鼠和绵羊的 PepT1 有 62.4 %, 62.5 %, 63.8 %, 64.8 % 和 65.1 % 的同源性。疏水性研究表明, cPepT1, 类似于哺乳动物的 PepT1, 有 12 个假想的穿膜区, 且在穿膜区 9 和 10 之间有一个大的胞外环(图2)。模型也预测到了氨基端和羧基端均位于膜

的胞质一侧。与其他种类动物的 PepT1 相比, 其穿膜区有 84 % 的同源性, 而胞外环仅有 21 % 的同源性。序列分析也表明 cPepT1 存在 PTR2 家族标记(family signatures), 他位于 cPepT1 的第 2 和第 3 个穿膜区(FALIADSWLGKFKTIV SLSIVYTI)以及第 5 个穿膜区的核心序列(FSIFYLAINAGSL, 图1)上。

human	.....MGM	SKSHSFFGYP	LSIFFIIVNE	FCERFSYVGM	RAILILYFTN	FISWDDNLST	AIYHTFVALC	YLTPILGALI	AD
rat	.....---	---RGC---	-----	-----	--L-V---R-	-LG---D---	-----	-----	---
mouse	.....---	---RGC---	-----	-----	--L-V---R-	-LG-----	-----	-----	---
rabbit	.....---	---L-C---	-----	-----	--L---R-	-G-----	V-----	-----	---
sheep	.....---	-VPK-C---	-----	-----	--L---QR	-LG-N---G-	-----	-----	---
chicken	MAAKSKSKGR	-VP.NC---	-----	-I--	-----	--V-V---KY	-LR---F--	-----	---
human	NDLTDHNDHG	TPDSLFPVHV	LSLIGLALIA	LGTGGIKPCV	SAFGGDQFEE	GQEKQRNRFF	<u>SIFYLAINAG</u>	SLSTIITPM	LR
rat	-----D---	S--NN--L--A	--M-----	-----	-----	-----	-----	-----I	---
mouse	-----D-N-	S-----A	--MV-----	-----	-----	-----	-----G-	-----I	---
rabbit	-E--N----	-----A	VCM---L--	-----	-----	-----	-----	-----V-	---
sheep	----F----	--NNIS--A	--M--V--	-----	-----	-----	-----	-----	---
chicken	--M--Q-R--	N--NIA--IA	--MT--I--	-----	-----	H-----S--	-----	--I-----I	---
human	IVFVLGSGMY	KKFKPQGNIM	GKVAKCIGFA	IKNRFHRHSK	AFPKREHWLD	WAKEKYDERL	ISQIKMVRTV	MFLYIPLPMF	WAI
rat	-----	---Q-----	-----R--	-----	-----N---	-----	-----IM-K-	-----	---
mouse	-----	---Q-----	-----	-----	-Y-----	-----	-----K-	---F-----	-G-
rabbit	---II-----	-----L	S--V---C--	-----	Q---A---	-----	-A-----	L-----	---
sheep	---I-----	--VQ-----	S--R-----	---IS---	K-----	--S-----	-----	-----	---
chicken	V--IA-----	--VQ-----	VR-C-----	-----	EY-----	--S---K--	-A-T---LK-	L-----	---
human	QNQTVNAILI	VIMVPIFDAV	LYPLIAKCGF	NFTSLKKMAV	GMVLASMAFV	VAAIVQVEID	KTLPVFPKGN	EVQIKVLNIG	NN
rat	-----	-----V---	V-----	-----T-	--F-----	VAAIVQVEID	-----S-	Q-----	---
mouse	-----N	-NNG-NV--	V-RS-----	-----T-	--F-----	-----	-----G-	Q-----	---
rabbit	-----T---	I-L--M---	V-----L	-----TI	--F-----	A--L-----	-----A-	-----V-	SEI
sheep	-----	-V---V---	V-----L	-----T-	--F-----	A-----D-	-----	-----	---
chicken	-----P---	I---VV---	I---Q--KI	---P-RRIT-	--F--GL--	A--LL--Q--	-----AAG	QA---II-L-	DSI
human	NKLTRINISS	PGSP.VTAVT	DDFKQQRHT	LLVWAPNHYQ	VVK.DGLNQK	PEKGENGIRF	VNTFNEIITI	TMSGKVYANI	SS
rat	DQ--S--V--	----G--T-A	HE-EP-H---	----G--L-R	---	-----	-S-L--M--	K-----E-V	T-I
mouse	D---S-----	S---G--T-A	H--E--H--N	---E-SQ-R	---	---P---	---L--MV-N	K-----EKF	T-I
rabbit	DT--S---T-	GSQ...MI-	PSLEA-----	-----N-R	--N---T-	SD-----	---YSQP-NV	-----EH-	A--
sheep	DN-.S-----	T-T-.-P--	HN-ES-H---	-----SN-	---	---R---	---AFG-SFGV	--D-E--N-V	-GI
chicken	SQ-KSMVMNF	GSESRSENID	SISSNHTTV-	IKNA-AGIVS	SLRS-NFTS-	--E-K-LV--	--NLPQTVN-	--GDTTFGIL	EEI
human	PNFNTFYLEF	GSAYTYIVQ.	RKNDSCPEVK	VFEDISANTV	NMALQIPQYF	LLTCGEVVFS	VTGLEFSYSQ	APSNMKSVLQ	AGN
rat	SD-KSSN-D-	-----VIRS	-AS-G-L--	E---PP--	-----	-----	-----	-----	---
mouse	TD-KSSN-D-	-----VIR.	-AS-G-L--	E---PP--	-----	-----	-----	-----	---
rabbit	RD-ESP----	-----LIT.	SQATG--QVT	E---PP--M	---W-----	-I-S-----	I-----	-----	---
sheep	KQ-KTS----	---F--VIS.	--S-G--P-	I---P--	S-----	-----	I-----	-----	---
chicken	-TSEK...-GY	-G--IVIN.	ECSGDVTQLR	YI---QP--	H--W-----	I-----	-----	-----	---
human	ILFAALLLVV	CVIFAIMARF	YTYINPAEIE	AQFDEDEKKN	RLEKSNPYFM	SGANSQKQM	-----	-----	---
rat	V--S-----	-I-----	-----	-----K	GVG-E---SS	LEPV--TN-	-----	-----	---
mouse	---S-----	-----	-----	-----K	GIG-E---SS	LEPV--TN-	-----	-----	---
rabbit	-----	---V-----	---E-----	K	NP--NDL-PS	LAPV--T--	-----	-----	---
sheep	V-----	-I-----	---V-----	---D-ED	D---AK	LDFV--T--	-----	-----	---
chicken	V-----FA-	-I---V--Y-	---TD-N-V-	--L--E---K	QIKQDPDLHG	KESEAVS--	-----	-----	---

图1 经过预测的人类、大鼠、小鼠、兔子、绵羊和鸡的肽转运载体 1(PepT1)的氨基酸直线排列顺序。与人的氨基酸序列相同的氨基酸用短横线(-)表示。具有下划线的氨基酸序列代表依质子的寡肽转运家族中 PTR2 的特征序列。引自 GenBank, 序列号为 AY029615。

大的胞外环含有4个潜在的与N-相连的糖基化位点, 分别位于Asn414 (N-F-S), Asn423(N-V-T), Asn485(N-F-T)和Asn508(N-I-T)处.在穿膜区1和2之间的胞外环上Asn56 (N-F-T)也有一个潜在的与N-相连的糖基化位点.预测的蛋白还包含一个潜在的依赖性蛋白激酶C(PKC)的磷酸化位点, 其位于穿膜区6和7的胞内环上(Ser272, S-E-K), 而且在穿膜区8和9之间的胞内环(The365, R-R-I-T)上有一个潜在的依赖性蛋白激酶A(PKA)的磷酸化位点.

在严格的杂交实验递质条件下, 十二指肠、空肠、回肠、肾脏和盲肠里检测到长为2.9 kb的mRNA.在十二指肠、空肠和回肠组织中, mRNA有非常强烈的杂交现象, 肾脏和盲肠的mRNA杂交现象较弱, 而其他组织, 包括肝脏、胰囊, 腺胃和腓骨肌上未检测到任何杂交的痕迹.尽管有实验表明<sup>[61, 62]</sup>大鼠的肌浆细胞(C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>)和绵羊的肌浆卫星细胞能够利用外源肽作为蛋白合成的前体, 但Chen et al<sup>[59]</sup> (2 002)在腓骨肌上未检测到任何mRNA的杂交痕迹.兔子、大鼠和人<sup>[7, 8, 12]</sup>的肝脏和肾脏中有PepT1 mRNA存在, 但在Chen et al<sup>[59]</sup>的研究中, cPepT1 mRNA在肾脏和盲肠中能勉强检测到一些, 而在肝脏中却未检测到任何cPepT1 mRNA的痕迹.说明cPepT1 mRNA的表达模式与其他动物的PepT1稍有不同.

对cPepT1功能特性的研究表明<sup>[59, 60]</sup>, 肽转运过程是一个依pH的过程, 且其最佳的pH为6.0和6.5 (优于pH在5.0、5.5和7.0).Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>或Ca<sup>2+</sup>对cPepT1的转运活性无任何影响. cPepT1对大多数的二肽和三肽有高的亲和性, 而四肽和游离氨基酸不能作为cPepT1的底物.

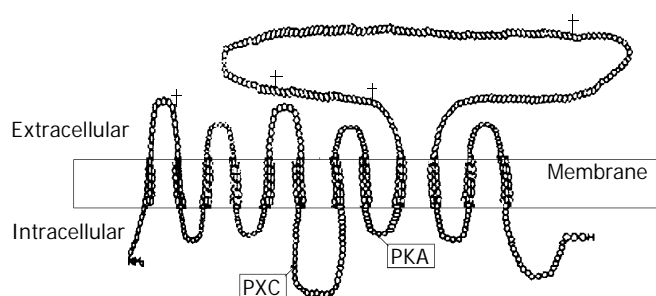


图2 鸡肽转运载体1 (PepT1)的穿膜区模型.疏水分析表明PepT1有12个假想的穿膜区, 且在9区和10区之间有一大的胞外环. \*表示潜在的与N相连的糖基化位点, PKC表示潜在的蛋白激酶C的磷酸化位点, PKA表示潜在的蛋白激酶A的磷酸化位点.

### 3 反刍动物的肽转运载体

**3.1 绵羊肽载体的结构** 绵羊肽转运载体(oPepT1)的cDNA长度为2 829 bp, 编码由707个的氨基酸组成的蛋白质, M<sub>r</sub>约为78 kD, 等电点为6.57<sup>[64]</sup>. oPepT1预测的氨基酸序列与人、大鼠和兔子的PepT1有83%、81%和78%的同源性(图1).

与人、兔子和大鼠的PepT1相比, oPepT1也有12个假想的穿膜区, 且在9区和10区之间有一长的胞外

环(200个氨基酸).氨基端和羧基端也位于膜的胞质一侧.但在长的胞外环上含有5个与N相连的糖基化位点, 分别位于Asn404 (N-N-S), Asn434 (N-L-S), Asn438 (N-I-S), Asn508 (N-V-S), Asn513 (N-A-S).在穿膜区3和4之间短的胞外环上观察到一个与N相连的糖基化位点, 位于Asn117 (N-I-S).预测的蛋白上包含4个潜在的依赖性蛋白激酶C(PKC)的磷酸化位点, 位于穿膜区6和7 (Ser252, S-K-K, Ser266, S-E-K), 8和9 (Ser357, S-L-K), 以及10和11 (Ser611, S-N-M-K)之间的胞内环上.还含有3个潜在的依赖性蛋白激酶A (PKA)的磷酸化位点, 位于穿膜区6和7 (Ser249, R-I-S, Ser275, R-L-I-S)以及8和9 (Thr362, K-M-T)之间的胞内环上<sup>[64]</sup>.

尽管oPepT1在结构上与其他动物的PepT1存在一定的相似性, 但他们之间还是有显著的区别.首先, oPepT1的等电点(6.57)低于其他动物PepT1的等电点(大鼠PepT1, PI 7.39; 兔子PepT1, PI 7.47; 人PepT1, PI 8.58).这可能是由于不同动物肠道的生理条件不同造成的.小肠和大肠的黏膜细胞, 以及胰腺和胆囊分泌的碳酸氢盐是一种基础的缓冲物质.胰腺和胆囊分泌的碳酸氢盐中和胃酸并提供合适的pH值用于酶对饲料组分的降解和营养物质的吸收.单胃动物小肠的pH值为5.5-6.0<sup>[63]</sup>.而对于反刍动物, 胰腺和胆囊分泌的碳酸氢盐不足以中和从胃运送到小肠的酸性物质.绵羊十二指肠和空肠上段的pH值为2.5到4.5, 直到空肠下段pH才接近6.因此, 反刍动物PepT1蛋白的等电点低于其他动物的等电点是可以理解的.第二, PepT1蛋白上潜在的磷酸化位点也存在显著的区别.兔子PepT1上仅有一个PKC的磷酸化位点和一个PKA的磷酸化位点<sup>[7]</sup>.人的PepT1上有两个PKC的磷酸化位点, 但没有PKA的磷酸化位点<sup>[8]</sup>.大鼠PepT1上有一个PKC的磷酸化位点和一个PKA的磷酸化位点<sup>[12]</sup>.Brandsch et al<sup>[68]</sup>的研究结果显示, 在人的Caco-2细胞里表达的H<sup>+</sup>依赖型肽转运系统可以被PKC调控.因此, 可以推测oPepT1可以被蛋白激酶调控.但是, 不同动物潜在的磷酸化位点不同与其生理作用有何关系目前还不清楚.第三, 电荷分配分析表明, oPepT1蛋白的672到691氨基酸之间有一负电荷团.与其他动物的PepT1相比, oPepT1的负电荷团里有更多带负电荷的氨基酸. PepT1和PepT2的化学功能分析显示, 大的胞外环和C末端对于转运系统的动力学特征没有影响<sup>[65]</sup>.因此, 这个范围很可能对肽转运蛋白运送到细胞或者调控转运功能有关, 因为潜在的PKC位点位于C末端. C末端的负电荷可能通过改变oPepT1蛋白插入到血浆膜的速度影响oPepT1的转运活性.

**3.2 羊和牛肽载体mRNA在组织上的分布** Northern Blot分析表明, 绵羊和泌乳奶牛的PepT1能够在小肠, 瓣胃和瘤胃中表达<sup>[64, 66]</sup>. poly(A)<sup>+</sup>RNA在这些组织中的表达模式为, 空肠和回肠的PepT1丰度最高, 瓣胃和十二指肠的较低, 瘤胃中的丰度最低. 小肠是oPepT1 mRNA表达的最主要位点.这一模式与以前报道的反刍动物蛋

白消化产物的主要吸收位点在小肠相一致.在绵羊和奶牛的真胃、肝脏、肾脏、盲肠和结肠中未检测到PepT1的存在<sup>[64,66]</sup>.尽管有实验表明,奶牛和小鼠的乳腺细胞能利用外源肽作为蛋白合成的前体<sup>[69-71]</sup>,但在Chen et al<sup>[66]</sup>和Pan et al<sup>[64]</sup>的实验中未能检测到乳腺中有PepT1的存在.其他研究者报道在兔子,大鼠和人的肝脏和肾脏能检测到PepT1 mRNA<sup>[7,8,12]</sup>,说明反刍动物肽载体mRNA的表达模式与其他动物有所不同.

3.3 绵羊肽转运载体的功能特点 Matthews et al<sup>[69]</sup>观察到Met-Gly和肌肽(-Ala-His)能够通过瘤胃和瓣胃上皮被吸收.底物浓度检测结果发现这种吸收基本上是非递质(non-mediated)的,且瓣胃上皮比瘤胃上皮更有能力吸收和转运这些肽.在其他研究中,oPepT1被提取出来并注射进非洲爪蛙的卵母细胞中<sup>[64,66,67,72]</sup>.注射了oPepT1的卵母细胞比注射水的卵母细胞能吸收更多的Gly-Sar,说明oPepT1能够在卵母细胞中表达.这种被表达的肽转运载体是依H<sup>+</sup>的,但与Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>或Ca<sup>2+</sup>无关.且Gly-Sar在注射了oPepT1的卵母细胞中的吸收是有饱和性的,吸收1 mM的Gly-Sar能够被5 mM的 $\beta$ -Ala-His, Met-Gly和Gly-Leu所抑制,但不被5 mM Gly抑制,说明这些二肽是通过相同的转运蛋白转运的,而Gly不是.pH对带电荷肽的转运影响较大,中性和阴性底物(Gly-Sar, Gly-Sar和Glu-Glu)通过oPepT1转运的最适pH为5.0,而阳性底物,Lys-Lys,最适pH为7.0.但在pH5.5时,Lys-Lys也能内向流动,说明在肠道的生理pH条件下(反刍动物的这一pH范围为4.5-5.0),oPepT1能转运带各种电荷的肽底物,只是中性和阴性肽可能比阳性肽转运的更快一些.这与兔子和人的PepT1在生理pH条件(5.5-6.0)下,优先转运中性和酸性肽底物<sup>[29,31]</sup>相一致.

Pan et al<sup>[73]</sup>为了研究影响肽载体亲和力的肽的结构特点,在pH 5.5时用注射了绵羊poly(A)RNA的非洲爪蛙的卵母细胞,研究了几种肽的转运情况.研究显示,注射了poly(A)RNA的卵母细胞能够转运二肽Gly-Sar, Gly-Leu, Gly-Pro, Phe-Leu, Leu-Leu;三肽Leu-Ser-Phe, Leu-Gly-Phe, Lys-Tyr-Lys, Ala-Pro-Gly, Meu-Leu-Phe, Leu-Leu-Tyr和四肽Met-Gly-Met-Met, Val-Gly-Asp-Glu, Ala-Gly-Ser-Glu, Val-Gly-Ser-Glu,但不能转运Pro-Phe-Gly-Lys, Val-Ala-Ala-Phe.且不能转运实验中的五肽、六肽、七肽和八肽.在所采用的实验条件下,能被转运的肽的分子量大小,疏水性,电荷的变化非常大.实验中二,三,四肽的转运能力与M<sub>r</sub>的相关关系是 $r=0.02$  ( $P=0.94$ ),转运与疏水性的相关关系是 $r=0.34$  ( $P=0.21$ ),转运与净电荷的相关关系是 $r=0.1$  ( $P=0.72$ ).因此,转运载体的转运能力似乎与被转运分子的M<sub>r</sub>,疏水性或带电量无关.对哺乳动物质子与肽转运载体耦联的研究中也发现,肽载体与肽底物的理化特点(即M<sub>r</sub>,电荷)无关.肽载体对底物的特异性表明,许多(但并不是所有的)二

肽、三肽、四肽能被转运,但游离氨基酸不能被转运.

Matthews et al<sup>[69]</sup>最初的研究表明,肽的吸收可能在很大程度上不需要载体介导,但是在反刍动物的胃区确实有肽转运载体的存在.从绵羊体内收集瓣胃上皮用于测定在其他肽存在的情况下Gly-Sar的吸收情况<sup>[74,75]</sup>.结果表明,Gly-Sar的吸收非但没有被抑制反而被促进了.这与我们所想象的多底物在同一转运体系被转运时,相互竞争的结果将会使Gly-Sar的转运受抑制(即吸收量减少)的结果相反.因此可以推测,通过消化道上皮的肽的转运可能涉及多种机制,而不是仅依靠肽转运载体转运.确认这些机制的存在并澄清这些机制的相互关系有利于更好的理解肽吸收的重要意义.

尽管许多动物的肽转运载体已被克隆和表达,其分子结构也逐渐明晰,但对不同肽载体分子结构与功能的关系却知之甚少.现尚有许多问题亟待研究:(1)肽转运载体表达上调和下调的细胞和分子机制;(2)肽载体结构和功能的关系,即怎样改变肽载体的分子构型从而获得最大的转运效果.对这个问题的回答有助于解释为什么PepT1是低亲和力/高容量的肽载体,而PepT2是高亲和力/低容量的肽载体<sup>[76]</sup>.(3)怎样调整类肽药物的结构使其与肽载体更好的亲和;(4)基底膜肽载体的研究.

#### 4 参考文献

- Webb KE Jr, Dirienzo DB, Matthews JC. Recent developments in gastrointestinal absorption and tissue utilization of peptides: a review. *J Dairy Sci* 1993;76:351-361
- Webb KE Jr, Matthews JC, DiRienzo DB. Peptide absorption: a review of current concepts and future perspectives. *J Anim Sci* 1992;70:3248-3257
- Webb KE Jr. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *J Anim Sci* 1990;68:3011-3022
- Webb KE Jr. Amino acid and peptide absorption from the gastrointestinal tract. *Fed Proc* 1986;45:2268-2271
- Gewirtz AT, Liu Y, Sitaraman SV, Madara JL. Intestinal epithelial pathobiology: past, present and future. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:851-867
- Boll M, Markovich D, Weber WM, Korte H, Daniel H, Murer H. Expression cloning of a cDNA from rabbit small intestine related to proton-coupled transport of peptides, beta-lactam antibiotics and ACE-inhibitors. *Pflügers Arch* 1994;429:146-149
- Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF, Singh SK, Boron WF, Hediger MA. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* 1994;368:563-566
- Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang-Feng TL, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH. Human intestinal H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 1995;270:6456-6463
- Saito H, Okuda M, Terada T, Sasaki S, Inui K. Cloning and characterization of a rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter mediating absorption of beta-lactam antibiotics in the intestine and kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1631-1637
- Terada T, Saito H, Sawada K, Hashimoto Y, Inui K. N-terminal halves of rat H<sup>+</sup>/peptide transporters are responsible for their substrate recognition. *Pharm Res* 2000;17:15-20
- Sawada K, Terada T, Saito H, Hashimoto Y, Inui K. Effects of glibenclamide on glycylsarcosine transport by the rat peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Br J Pharmacol* 1999;128:1159-1164

- 12 Miyamoto K, Shiraga T, Morita K, Yamamoto H, Haga H, Taketani Y, Tamai I, Sai Y, Tsuji A, Takeda E. Sequence, tissue distribution and developmental changes in rat intestinal oligopeptide transporter. *Biochim Biophys Acta* 1996;1305: 34-38
- 13 Fei YJ, Ganapathy V, Leibach FH. Molecular and structural features of the proton-coupled oligopeptide transporter superfamily. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;58:239-261
- 14 Saito H, Terada T, Okuda M, Sasaki S, Inui K. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim Biophys Acta* 1996;1280:173-177
- 15 Boll M, Herget M, Wagener M, Weber WM, Markovich D, Biber J, Clauss W, Murer H, Daniel H. Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:284-289
- 16 Liu W, Liang R, Ramamoorthy S, Fei YJ, Ganapathy ME, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH. Molecular cloning of PEPT 2, a new member of the H<sup>+</sup>/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochim Biophys Acta* 1995;1235: 461-466
- 17 Amasheh S, Wenzel U, Weber WM, Clauss W, Daniel H. Electrophysiological analysis of the function of the mammalian renal peptide transporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol* 1997;504( Pt 1):169-174
- 18 Wenzel U, Diehl D, Herget M, Daniel H. Endogenous expression of the renal high-affinity H<sup>+</sup>-peptide cotransporter in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):C1573-1579
- 19 Daniel H, Herget M. Cellular and molecular mechanisms of renal peptide transport. *Am J Physiol* 1997;273(1 Pt 2):F1-8
- 20 Boll M, Herget M, Wagener M, Weber WM, Markovich D, Biber J, Clauss W, Murer H, Daniel H. Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:284-289
- 21 Nussberger S, Steel A, Trotti D, Romero MF, Boron WF, Hediger MA. Symmetry of H<sup>+</sup> binding to the intra- and extra-cellular side of the H<sup>+</sup>-coupled oligopeptide cotransporter PepT1. *J Biol Chem* 1997;272:7777-7785
- 22 Pan X, Terada T, Irie M, Saito H, Inui K. Diurnal rhythm of H<sup>+</sup>-peptide cotransporter in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G57-64
- 23 Turner JR, Black ED, Ward J, Tse CM, Uchwat FA, Alli HA, Donowitz M, Madara JL, Angle JM. Transepithelial resistance can be regulated by the intestinal brush-border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C1918-1924
- 24 Lister N, Bailey PD, Collier ID, Boyd CA, Bronk JR. The influence of luminal pH on transport of neutral and charged dipeptides by rat small intestine, in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1324:245-250
- 25 Lister N, Sykes AP, Bailey PD, Boyd CA, Bronk JR. Dipeptide transport and hydrolysis in isolated loops of rat small intestine: effects of stereospecificity. *J Physiol* 1995;484( Pt 1):173-182
- 26 Chen Z, Fei YJ, Anderson CM, Wake KA, Miyauchi S, Huang W, Thwaites DT, Ganapathy V. Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *J Physiol* 2003;546(Pt 2):349-361
- 27 Fei YJ, Nara E, Liu JC, Boyd CA, Ganapathy V, Leibach FH. Preferential recognition of zwitterionic dipeptides as transportable substrates by the high-affinity peptide transporter PEPT2. *Biochim Biophys Acta* 1999;1418:344-351
- 28 Mackenzie B, Fei YJ, Ganapathy V, Leibach FH. The human intestinal H<sup>+</sup>/oligopeptide cotransporter hPEPT1 transports differently-charged dipeptides with identical electrogenic properties. *Biochim Biophys Acta* 1996;1284:125-128
- 29 Amasheh S, Wenzel U, Boll M, Dorn D, Weber W, Clauss W, Daniel H. Transport of charged dipeptides by the intestinal H<sup>+</sup>/peptide symporter PepT1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Membr Biol* 1997;155:247-256
- 30 Brandsch M, Brandsch C, Ganapathy ME, Chew CS, Ganapathy V, Leibach FH. Influence of proton and essential histidyl residues on the transport kinetics of the H<sup>+</sup>/peptide cotransport systems in intestine (PEPT 1) and kidney (PEPT 2). *Biochim Biophys Acta* 1997;1324:251-262
- 31 Steel A, Nussberger S, Romero MF, Boron WF, Boyd CA, Hediger MA. Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1. *J Physiol* 1997;498( Pt 3):563-569
- 32 Fei YJ, Liu W, Prasad PD, Kekuda R, Oblak TG, Ganapathy V, Leibach FH. Identification of the histidyl residue obligatory for the catalytic activity of the human H<sup>+</sup>/peptide cotransporters PEPT1 and PEPT2. *Biochemistry* 1997;36:452-460
- 33 Chen XZ, Steel A, Hediger MA. Functional roles of histidine and tyrosine residues in the H<sup>+</sup>-peptide transporter PepT1. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:726-730
- 34 Terada T, Saito H, Inui K. Interaction of beta-lactam antibiotics with histidine residue of rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporters, PEPT1 and PEPT2. *J Biol Chem* 1998;273:5582-5585
- 35 Terada T, Saito H, Mukai M, Inui KI. Identification of the histidine residues involved in substrate recognition by a rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter, PEPT1. *FEBS Lett* 1996;394:196-200
- 36 Ganapathy V, Balkovetz DF, Ganapathy ME, Mahesh VB, Devoe LD, Leibach FH. Evidence for histidyl and carboxy groups at the active site of the human placental Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Biochem J* 1987;245:473-477
- 37 Fei YJ, Liu JC, Fujita T, Liang R, Ganapathy V, Leibach FH. Identification of a potential substrate binding domain in the mammalian peptide transporters PEPT1 and PEPT2 using PEPT1-PEPT2 and PEPT2-PEPT1 chimeras. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:39-44
- 38 Muller U, Brandsch M, Prasad PD, Fei YJ, Ganapathy V, Leibach FH. Inhibition of the H<sup>+</sup>/peptide cotransporter in the human intestinal cell line Caco-2 by cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218:461-465
- 39 Terada T, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui K. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol* 1999;276(6 Pt 1):G1435-1441
- 40 Daniel H, Adibi SA. Selective effect of zinc on uphill transport of oligopeptides into kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J* 1995;9:1112-1117
- 41 Freeman TC, Bentsen BS, Thwaites DT, Simmons NL. H<sup>+</sup>/di-tripeptide transporter (PepT1) expression in the rabbit intestine. *Pflugers Arch* 1995;430:394-400
- 42 Wang H, Fei YJ, Ganapathy V, Leibach FH. Electrophysiological characteristics of the proton-coupled peptide transporter PEPT2 cloned from rat brain. *Am J Physiol* 1998;275(4 Pt 1): C967-975
- 43 Terada T, Sawada K, Irie M, Saito H, Hashimoto Y, Inui K. Structural requirements for determining the substrate affinity of peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Pflugers Arch* 2000; 440:679-684
- 44 Ogihara H, Saito H, Shin BC, Terada Y, Takenoshita S, Nagamachi Y, Inui KI, Takata K. Immuno-localization of H<sup>+</sup>/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;848-852
- 45 Terada T, Saito H, Mukai M, Inui K. Characterization of stably transfected kidney epithelial cell line expressing rat H<sup>+</sup>/peptide cotransporter PEPT1: localization of PEPT1 and transport of beta-lactam antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281:1415-1421
- 46 Ganapathy ME, Prasad PD, Mackenzie B, Ganapathy V, Leibach FH. Interaction of anionic cephalosporins with the intestinal and renal peptide transporters PEPT 1 and PEPT 2. *Biochim Biophys Acta* 1997;1324:296-308
- 47 Ganapathy ME, Brandsch M, Prasad PD, Ganapathy V, Leibach FH. Differential recognition of beta-lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J Biol Chem* 1995;270:25672-25677

- 48 Nusrat A, von Eichel-Streiber C, Turner JR, Verkade P, Madara JL, Parkos CA. Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier function by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. *Infect Immun* 2001;69:1329-1336
- 49 Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G851-857
- 50 Temple CS, Stewart AK, Meredith D, Lister NA, Morgan KM, Collier ID, Vaughan-Jones RD, Boyd CA, Bailey PD, Bronk JR. Peptide mimics as substrates for the intestinal peptide transporter. *J Biol Chem* 1998;273:20-22
- 51 Sugawara M, Huang W, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V, Ganapathy ME. Transport of valganciclovir, a ganciclovir prodrug, via peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *J Pharm Sci* 2000;89:781-789
- 52 Inui K, Terada T, Masuda S, Saito H. Physiological and pharmacological implications of peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15( Suppl 6):11-13
- 53 Ganapathy ME, Huang W, Wang H, Ganapathy V, Leibach FH. Valacyclovir: a substrate for the intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:470-475
- 54 Daniel H, Adibi SA. Functional separation of dipeptide transport and hydrolysis in kidney brush border membrane vesicles. *FASEB J* 1994;8:753-759
- 55 Minami H, Daniel H, Morse EL, Adibi SA. Oligopeptides: mechanism of renal clearance depends on molecular structure. *Am J Physiol* 1992;263(1 Pt 2):F109-115
- 56 Daniel H, Morse EL, Adibi SA. The high and low affinity transport systems for dipeptides in kidney brush border membrane respond differently to alterations in pH gradient and membrane potential. *J Biol Chem* 1991;266:19917-19924
- 57 Daniel H, Morse EL, Adibi SA. Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H<sup>+</sup> symporter in the renal brush border membrane. *J Biol Chem* 1992;267:9565-9573
- 58 Yamashita T, Shimada S, Guo W, Sato K, Kohmura E, Hayakawa T, Takagi T, Tohyama M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem* 1997;272:10205-10211
- 59 Chen H, Pan Y, Wong EA, Bloomquist JR, Webb KE Jr. Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (cPepT1) in Xenopus oocytes and Chinese hamster ovary cells. *J Nutr* 2002;132:387-393
- 60 Pan Y, Wong EA, Dibner JJ, Vazquez-Anon M, Webb KE Jr. Poly(A)(+) RNA encoding proteins capable of transporting L-methionine and/or DL-2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid are present in the intestinal mucosa of broilers. *J Nutr* 2002;132:382-386
- 61 Pan Y, Bender PK, Akers RM, Webb KE Jr. Methionine-containing peptides can be used as methionine sources for protein accretion in cultured C2C12 and MAC-T cells. *J Nutr* 1996;126:232-241
- 62 Pan Y, Webb KE Jr. Peptide-bound methionine as methionine sources for protein accretion and cell proliferation in primary cultures of ovine skeletal muscle. *J Nutr* 1998;128:251-256
- 63 Ganapathy V, Leibach FH. Electrogenic transport of 5-oxoproline in rabbit renal brush-border membrane vesicles. Effect of intravesicular potassium. *Biochim Biophys Acta* 1983;732:32-40
- 64 Pan Y, Wong EA, Bloomquist JR, Webb KE Jr. Expression of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPepT1) in Xenopus oocytes induces uptake of oligopeptides in vitro. *J Nutr* 2001;131:1264-1270
- 65 Doring F, Dorn D, Bachfischer U, Amasheh S, Herget M, Daniel H. Functional analysis of a chimeric mammalian peptide transporter derived from the intestinal and renal isoforms. *J Physiol* 1996;497( Pt 3):773-779
- 66 Chen H, Wong EA, Webb KE Jr. Tissue distribution of a peptide transporter mRNA in sheep, dairy cows, pigs, and chickens. *J Anim Sci* 1999;77:1277-1283
- 67 Matthews JC, Wong EA, Bender PK, Bloomquist JR, Webb KE Jr. Demonstration and characterization of dipeptide transport system activity in sheep omasal epithelium by expression of mRNA in Xenopus laevis oocytes. *J Anim Sci* 1996;74:1720-1727
- 68 Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H<sup>+</sup> co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. *Biochem J* 1994;299( Pt 1):253-260
- 69 Matthews JC, Webb KE Jr. Absorption of L-carnosine, L-methionine, and L-methionylglycine by isolated sheep ruminal and omasal epithelial tissue. *J Anim Sci* 1995;73:3464-3475
- 70 Wang S, Webb KE Jr, Akers MR. Peptide-bound methionine can be a source of methionine for the synthesis of secreted proteins by mammary tissue explants from lactating mice. *J Nutr* 1996;126:1662-1672
- 71 Backwell FR, Bequette BJ, Wilson D, Calder AG, Metcalf JA, Wray-Cahen D, MacRae JC, Beever DE, Lobley GE. Utilization of dipeptides by the caprine mammary gland for milk protein synthesis. *Am J Physiol* 1994;267(1 Pt 2):R1-6
- 72 Chen H, Pan YX, Wong EA, Webb KE Jr. Characterization and regulation of a cloned ovine gastrointestinal peptide transporter (oPepT1) expressed in a mammalian cell line. *J Nutr* 2002;132:38-42
- 73 Pan YX, Wong EA, Bloomquist JR, Webb KE Jr. Poly(A)+ RNA from sheep omasal epithelium induces expression of a peptide transport protein(s) in Xenopus laevis oocytes. *J Anim Sci* 1997;75:3323-3330
- 74 McCollum MQ, Webb KE Jr. Glycyl-L-sarcosine absorption across ovine omasal epithelium during incubation with other peptide substrates and volatile fatty acids. *J Anim Sci* 1998;76:2706-2711
- 75 McCollum MQ, Vazquez-Anon M, Dibner JJ, Webb KE Jr. Absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid by isolated sheep ruminal and omasal epithelia. *J Anim Sci* 2000;78:1078-1083
- 76 Adibi SA. Renal assimilation of oligopeptides: physiological mechanisms and metabolic importance. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 1):E723-36



# 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展

蒋业贵, 李兆申

蒋业贵, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科  
上海市 200433  
项目负责人: 蒋业贵, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科. jiangyegui@yahoo.com.cn  
电话: 021-25070556  
收稿日期: 2002-12-05 接受日期: 2002-12-27

## 摘要

活化肝星状细胞(HSC)数量的增加是肝纤维化形成的中心环节, 凋亡则导致其数量的减少. HSC是肝纤维化过程中产生细胞外基质(ECM)的主要细胞, ECM 过多产生是形成肝纤维化, 最终导致肝硬化、肝功能衰竭的主要原因. 因此, 可从抑制 HSC 激活、促进 HSC 凋亡两方面进行抗肝纤维化治疗. 加强 HSC 的激活和凋亡调控机制的研究, 有助于我们认识 HSC 激活和凋亡及肝纤维化发生的本质.

蒋业贵, 李兆申. 肝星状细胞与肝纤维化的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1443-1446  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1443.asp>

## 0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝脏的一种非实质细胞, 位于 Disse 隙内, 围绕在肝窦周围. 研究表明, 肝纤维化的中心环节是 HSC 在组织炎症坏死区域向肌成纤维细胞(myofibroblasts, MFB)转型的激活过程. 激活的结果导致 MFB 膨胀池的产生, 即由于 MFB 生成与清除速度的不平衡, 造成 MFB 数量的增加, 产生大量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 促进肝纤维化的形成<sup>[1-4]</sup>. 肝纤维化恢复期, 激活状态的 HSC 减少主要通过凋亡机制, 而不是表型的转化.

## 1 HSC 表型的激活

激活过程可分为两个阶段: 启动阶段和持续阶段, 启动阶段是指基因表达及表型的早期变化使其具有对细胞因子和刺激的反应性; 持续阶段指由于这些刺激的作用而维持星状细胞的激活状态并有纤维形成<sup>[5]</sup>.

1.1 HSCs 激活后呈现的生物学特点 正常肝脏中, HSC 处于静息状态, 增生活性很低, 具有以下几方面的功能<sup>[6]</sup>: 合成细胞外基质(ECM)、调节肝窦血流<sup>[7]</sup>、摄取并储存维生素 A 和调节肝细胞再生. 在肝损伤及各种慢性肝病时 HSC 被激活, 其表型由静息型转变为激活型. 目前认为, HSC 表型激活是肝纤维化形成过程中的一个关键病理过程. 激活的 HSC 具有以下几方面的特点: (1)增生活性明显增强<sup>[8]</sup>; (2)胞质中脂滴减少或消失; (3)

HSC 转变为 MFB, 表达平滑肌  $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -SMA); (4)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换增加, 大量的细胞外  $\text{Na}^+$  进入 HSC 内, 促进 HSC 增生及胶原合成<sup>[9-12]</sup>, 包括各种基质蛋白、蛋白多糖及糖胺多糖等<sup>[13]</sup>. 此外尚可表达一种 VI 型中间丝蛋白<sup>[14]</sup>; (5)电压门控  $\text{Ca}^{2+}$  通道开放, 胞质  $\text{Ca}^{2+}$  增加, MFB 因此具有收缩能力, 对内皮素-1 (endothelin-1, ET-1), 血管加压素及 angiotensin II 产生收缩性应答<sup>[15]</sup>; (6)表达并分泌各种具有促炎性及致纤维化作用的细胞因子及黏附分子等; MFB 表达 NF- $\kappa$ B, 诱导 ICAM-1 及 IL-6 表达, 从而引起白细胞与窦内皮细胞黏附和向病变部位迁移<sup>[16, 17]</sup>. MFB 还表达单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), 并与 MCP-1 受体结合, 引起胞质  $\text{Ca}^{2+}$  增加, 促使 MFB 向病变处移动<sup>[18, 19]</sup>. (7)基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)的合成及分泌增加, 使肝纤维化时一些 ECM 成分的降解减少. HSC 激活后出现多种基因的表达, 到目前为止, 尚未找到一种只在激活的 HSC 中特异性表达的基因<sup>[20-23]</sup>.

1.2 HSC 激活的调控 最早对 HSC 产生作用的因素大多是旁分泌性的, 肝纤维化能否呈进行性发展, 除与各种致肝损伤因素是否持续存在有关外, 更重要的是与肝损伤病变是否继续活动有关, 炎症反应与 HSC 的活化关系密切, 如在慢性丙型肝炎肝纤维化形成过程中观察到: 活化的 HSC 的出现无论在时间还是位置上都与 Th1 样反应, 有关而与丙肝病毒是否存在无关<sup>[24]</sup>. NF- $\kappa$ B 的上调可导致靶基因大量激活, 包括细胞因子、趋化因子, NF- $\kappa$ B 通过调控他们的转录参与星状细胞的激活<sup>[25, 26]</sup>. 但也有不同的报道, Lang et al<sup>[27]</sup>表明 NF- $\kappa$ B 在 HSC 的早期激活过程中是非必需的. 在静止的 HSC 中 *zif-9* 不表达或仅有微量表达, HSC 激活后其表达大大增加, 从而增加胶原的合成<sup>[28]</sup>. Potter et al<sup>[29]</sup>发现 *c-myc* 在肝星状细胞发生表型改变之前表达提高, *c-myc* 的一过性表达提高可能参与了肝星状细胞的早期激活过程. 4-羟基壬二酸(HNE)也可引起 AP-1 的转录活性上调<sup>[30]</sup>, AP-1 的靶基因  $\alpha$ 1(I)胶原及 TGF  $\beta$ 1 的转录增强. Ets-1 蛋白的 DNA 结合能力在 HSC 激活过程中下调及已知的 Ets-1 在细胞分化和组织修复中的作用, 表明转录因子 Ets-1 可能在 HSC 激活和肝组织修复中有特殊的重要意义<sup>[31]</sup>. 近年来的研究还发现, 朊病毒相关蛋白(PrP)、Rho 蛋白、钠/钙离子体交换蛋白及氢/钠离子体交换蛋白、过氧化酶体增生激活受体等也是参与 HSC 早期激活过程的重要信号转导物质, 对他们的研究也在不断深入<sup>[32, 33]</sup>. 一旦 HSC 的激活被启动, 多种因素协同

作用,在维持HSC激活状态的同时,促进肝纤维化等病理改变.HSC的活化是肝纤维化发生的核心环节,许多因素参与了该过程的调节,其中转化生长因子(TGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、血管内皮生长因子(VEGF)等细胞因子起主要作用<sup>[34-39]</sup>.TGF- $\alpha$ 可诱导HSC表达血小板衍生生长因子(PDGF)受体而促进增生.TNF- $\alpha$ 可促进HSC表达MMP和TIMP,TGF $\beta$ 1抑制MMP的合成,促进TIMP的合成,其最终结果是MMP表达减少,TIMP表达增加,ECM降解减少,TIMP表达增加,ECM降解减少,在肝内沉积增加<sup>[40]</sup>.此外,氧自由基(ROS)也可诱导HSC活化增生和胶原基因表达<sup>[41]</sup>.金属蛋白酶组织阻止剂-1(TIMP-1)通过对HSC基质金属蛋白酶(MMP)分泌的抑制,促进HSC增生;但在TIMP-1转基因小鼠中,TIMP-1的大量表达并不能直接引起HSC的活化<sup>[42]</sup>.有人提出了HSC激活的级联模式,即被损伤的肝细胞释放的TGF、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)、ET-1等细胞因子所促进的炎症前期;被激活的kuppfer细胞分泌的因子如TGF- $\beta$ 、TNF、TGF- $\alpha$ 介导的炎症期;HSC转化为MFB,通过TGF- $\beta$ 、ET-1、PDGF、IL-6的自分泌刺激的炎症后期.激活的HSC增加表达TIMP,促使某些ECM成分(如I型胶原)异常集聚,也扰乱了正常的ECM环境,这种异常的ECM环境在维持HSCs的激活状态促进肝纤维化中也起着重要作用<sup>[43]</sup>.

## 2 HSCs的凋亡及其调控机制

2.1 HSC凋亡 在实验性肝损伤模型中,HSC增生,当去除损伤因素后,肝脏恢复其正常组织结构,HSC的数量也恢复正常.目前认为肝细胞损伤修复中激活的HSC数量降低主要是通过HSC凋亡将激活的HSC清除.体外培养试验表明,静止的HSC不发生凋亡,HSC在活化的同时出现自发性凋亡.凋亡调节蛋白Bcl-2,p53在静止HSC中不表达,而后逐渐增加.在转化为MFB的过程中HSC对FasL诱导的凋亡变得敏感,而未被刺激的HSC则表现出抵抗,如果RNA或蛋白质合成被阻断,MFB则对FasL介导的凋亡变得高度敏感,这表明在肝中MFB是FasL介导凋亡的靶细胞<sup>[44,45]</sup>.体内肝脏急性损伤时,HSC活化、增生而无凋亡;恢复阶段,HSC总数减少,凋亡增加,分泌新纤维间质和TIMP的活化的HSC数量减少<sup>[46]</sup>.因此,活化HSC的凋亡可能与肝纤维的自发性降解有关.四氯化碳引起的大鼠急性肝损伤时,HSC的数量随着肝组织坏死和炎症细胞浸润的出现而显著增多,随着肝组织的恢复而迅速下降,此过程中凋亡HSC数量与活化HSC总数平行;慢性损伤肝纤维化恢复期时,MFB在降至一较低水平之前,凋亡的MFB大量增加.Gong et al<sup>[45]</sup>将与放线菌酮结合的可溶性FasL加入原代培养不同时间的HSC中,发现原代培养后期(7 d)或继代培养4 d后的HSC中凋亡反应与可溶性FasL呈剂量依赖关系,说

明Fas受体途径是HSC凋亡的重要途径.HSC在向MFB转型过程中对可溶性FasL敏感性的逐渐增强与bcl-2、bcl-XL和bax的表达有关.

2.2 HSC凋亡的调控机制 HSC的凋亡与其激活过程是平行的,静止的HSC无凋亡发生,HSC凋亡的前提是其表型由静止向激活转化.培养的HSC随表型向激活状态的转化,也可发生自发性凋亡,是通过激活而诱导的Fas/FasL表达增加引起的.TNF- $\alpha$ 对激活的HSC可产生凋亡诱导作用,此作用可被NF- $\kappa$ B所阻断.NF- $\kappa$ B对肝脏再生及炎症反应均有调节作用,抑制NF- $\kappa$ B可以影响HSC的激活过程.NF- $\kappa$ B可被TNF- $\alpha$ 激活,其对TNF- $\alpha$ 信号转导诱发的凋亡是一种负反馈调节机制.他通过其产生的一组基因产物的协同作用抑制TNF- $\alpha$ 诱发的caspase-8的激活从而阻止凋亡<sup>[47]</sup>.Lang et al<sup>[27]</sup>研究发现NF- $\kappa$ B对于HSC活化增生不具备影响,但可作为TNF $\alpha$ 诱导HSC凋亡的拮抗因子.NF- $\kappa$ B可通过刺激活化HSC表达基因拮抗小鼠HSC的凋亡<sup>[48]</sup>.TGF $\beta$ 过量表达是凋亡发生的主要因素之一<sup>[49]</sup>.人们对于TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 诱导HSC凋亡作用尚有不一致看法,Saile et al<sup>[50]</sup>观察到在CCL<sub>4</sub>致肝纤维化大鼠模型中,TNF $\alpha$ 及TGF $\beta$ 可阻止MFB表达凋亡标志物FasL,阻止MFB发生凋亡.一些细胞因子和生长因子如内皮素、血小板衍生生长因子、胰岛素样生长因子结合蛋白-3、神经生长因子、IL-6、IL-15等也可能对HSC的凋亡有调节作用.Trim et al<sup>[51]</sup>发现,神经生长因子(NGF)也具有诱导HSC凋亡的作用.将100 ng/mL NGF与表达其配体p75(TNF表达受体家族成员)的HSC共同培养24 h后,HSC凋亡细胞数量明显增加,而对HSC的增生不产生影响.

## 3 针对HSC的抗纤维化治疗

活化HSC数量的增加是肝纤维化形成的中心环节,凋亡则导致其数量的减少.HSC是肝纤维化过程中产生细胞外基质(ECM)的主要细胞,ECM过多产生是形成肝纤维化,最终导致肝硬化、肝功能衰竭的主要原因.因此,可从抑制HSC激活、促进HSC凋亡两方面进行抗肝纤维化治疗.由于激活的HSC是肝纤维化时ECM的主要来源细胞,因此,可以设想通过抑制HSC达到抗肝纤维化的作用, $\alpha$ -干扰素在改善慢性病毒性肝炎患者肝组织病变的同时,明显减少 $\alpha$ -SMA(+)HSC数量. $\gamma$ -干扰素减少实验性肝纤维化大鼠肝内I、III型前胶原mRNA表达、减少HSC的数量及抑制HSC的激活<sup>[52]</sup>.近年来,中医中药治疗肝纤维化显示出特有的优越性<sup>[53-65]</sup>.小柴胡汤可通过抑制HSC的增生与激活,抑制胶原的合成<sup>[66]</sup>.己酮可可碱通过抑制PDGF介导的HSC激活,而具有抗肝纤维化的作用.脯氨酸4-羟化酶抑制剂HOE077也可通过抑制HSC的激活而抗肝纤维化.视黄酸可阻止PDGF引起的HSC增生,还通过增加胞质素含量促进MMP活化而促进ECM的降

解. 视黄醇可抑制 HSC 的增生及胶原合成. 多烯磷脂酰胆碱可阻断 PDGF 激活通路中 MARK/P44 活化及 AP-1 结合, 抑制 PDGF 的增生效应. 丹参酸乙可抑制体外培养 HSC 的增生, 这种抑制作用与丹参酸乙的抗氧化作用有一定的关系<sup>[67]</sup>. 目前纤维化的可逆性及 HSC 在肝纤维化逆过程中的重要作用已受到广泛重视, 如 HSC 活化后其表型难以逆转, 通过凋亡使 HSC 减少为较为合理的逆转肝纤维化思路. HSC 凋亡的激活可能是自然的调节过程, 对其机制的研究可能指导未来抗肝纤维化的治疗策略. 抑制 NK- $\kappa$ B 不仅可抑制 HSC 介导的肝内炎症反应, 还可促进激活的 HSC 的凋亡, 抑制肝纤维化的发展. 在纤维化肝脏中激活的 HSC 发生凋亡不仅使其数量明显减少, ECM 的合成数量下降, 减少了 ECM 在肝脏中的继续堆积, 而且使其合成的 TIMP-1, TIMP-2 快速下降, MMPs 的表达仍维持在肝纤维化时的水平, 但 TIMPs 减少解除了其对 MMPs 活性的抑制, 进一步降解已形成的纤维化性胶原, 从两方面造成了肝纤维化的逆转. 尤红 et al<sup>[68]</sup>也从体外培养和慢性乙型肝炎的治疗两方面探讨了 HSC 凋亡的现象和意义, 提示活化的 HSC 存在凋亡, 促进其凋亡在肝纤维化治疗中有重要作用. 将 HSC 作为抗肝纤维化治疗的靶细胞, 尚须注意下列情况: (1)目前尚未在 HSC 上找到任何完全特异的基因或受体分子等, 任何对 HSC 某项功能的干预都须考虑对肝内或肝外其他细胞的副作用. (2)目前对 HSC 的生物学研究绝大多数是在大鼠 HSC 上进行的, 虽然人与大鼠 HSC 的生物学特点有许多相似之处, 但从大鼠 HSC 所获得的研究结果并不能完全应用到人 HSC 上, 因此有必要对人与大鼠 HSC 进行较系统的比较研究或直接对人 HSC 进行研究. 加强 HSC 的激活和凋亡调控机制的研究, 有助于我们认识 HSC 激活和凋亡及肝纤维化发生的本质. 从长远来看, 干预 HSC 活化和促进 HSC 凋亡是抗肝纤维化治疗的一个重要靶向, 这一方面的研究亟待深入.

#### 4 参考文献

- 王佐佑, 肖冰, 时永全, 赵燕秋, 樊代明. 转染 Bcl-2 反义核酸对胃癌细胞药物敏感性的影响. 世界华人消化杂志 1999;7:796-797
- 姜慧卿, 张晓岚. 肝纤维化的发生机制. 世界华人消化杂志 2000;8:687-689
- 贾继东, 尹姗姗, 王宝恩. 细胞外基质基因在肝脏的表达与调控. 世界华人消化杂志 2002;10:56-57
- 王雅凡, 李奇芬, 王洪, 毛青, 吴纯清. 维生素 E 抗大鼠实验性肝纤维化的作用. 华人消化杂志 1998;6:207-209
- Li D, Friedman SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:618-633
- Burt AD. Pathobiology of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol* 1999;34:299-304
- Thimman MS, Yee HF Jr. Quantitation of rat hepatic stellate cell contraction: stellate cells' contribution to sinusoidal resistance. *Am J Physiol* 1999;277(1 pt 1):G137-G143
- 朱永红, 胡大荣, 聂青和, 刘国栋, 谭朝霞. 人肝脏星形细胞培养激活及其 c-fos, c-jun 的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:299-302
- Svegliati-Baroni G, DiSario A, Casini A, Ferretti G, D' Ambrosio L, Ridolfi F, Bolognini L, Salzano R, Orlandi F, Benedetti A. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 1999;30:868-875
- Liu C, Liu P, Liu CH, Zhu XQ, Ji G. Effects of Fuzhenghuayu decoction on collagen synthesis of cultured hepatic stellate cells, hepatocytes and fibroblasts in rats. *World J Gastroenterol* 1998;4:548-549
- Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:877-880
- Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:115-119
- 黄光存, 张锦生. 肝星状细胞激活的细胞内信号转导. 世界华人消化杂志 2001;9:1056-1060
- Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, Geerts A. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;29:520-527
- Buck M, Kim DJ, Houghlum K, Hassanein T, Chojkier M. c-Myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G321-G328
- Hellerbrand C, Jobin C, Iimuro Y, Licato L, Sartor RB, Brenner DA. Inhibition of NFkappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor. *Hepatology* 1998;27:1285-1295
- 陆伦根, 曾民德, 李继强, 邱德凯, 华静, 范竹萍. 肝星状细胞激活与 ICAM-1 的表达. 华人消化杂志 1998;6:567-569
- Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, Pinzani M, Laffi G, Montalto P, Gentilini P. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;29:140-148
- 周光德, 赵景民. 细胞外基质在肝内的代谢与肝纤维化的形成. 世界华人消化杂志 2002;10:57-59
- Watanabe S, Hirose M, Wang XE, Ikejima K, Oide H, Kitamura T, Takei Y, Miyazaki A, Sato N. A novel hepatic stellate (Ito) cell-derived protein, epimorphin, plays a key role in the late stages of liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:486-490
- Potter JJ, Womack L, Mezey E, Anania FA. Transdifferentiation of rat hepatic stellate cells results in leptin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:178-182
- Kitada T, Seki S, Ikeda K, Nakatani K, Sakaguchi H, Kawada N, Kadoya H, Kaneda K. Clinicopathological characterization of prion: a novel marker of activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;33:751-757
- Ratzliff V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9500-9505
- Baroni GS, Pastorelli A, Manzin A, Benedetti A, Marucci L, Solforosi L, DiSario A, Brunelli E, Orlandi F, Clementi M, Macarri G. Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis are associated with necroinflammatory injury and Th1-like response in chronic hepatitis C. *Liver* 1999;19:212-219
- Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001;166:6812-6819
- 刘文滨, 王吉耀. NF-KB 与肝星状细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2001;9:1054-1055
- Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000;33:49-58
- Kojima S, Hayashi S, Shimokado K, Suzuki Y, Shimada J, Crippa MP, Friedman SL. Transcriptional activation of urokinase by the Kruppel-like factor Zf9/COPEB activates latent TGF-beta1 in vascular endothelial cells. *Blood* 2000;95:1309-1316
- Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Anania FA, Mezey E. A transient increase in c-myc precedes the transdifferentiation of hepatic stellate cells to myofibroblast-like cells. *Liver* 1999;19:135-144

- 30 Parola M, Robino G, Dianzani MU. 4-hydroxy-2,3-alkenals as molecular mediators of oxidative stress in the pathogenesis of liver fibrosis. *Int J Mol Med* 1999;4:425-432
- 31 Knittel T, Dinter C, Kobold D, Neubauer K, Mehde M, Eichhorst S, Ramadori G. Expression and regulation of cell adhesion molecules by hepatic stellate cells (HSC) of rat liver: involvement of HSC in recruitment of inflammatory cells during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1999;154:153-167
- 32 Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000;275:35715-35722
- 33 刘涛, 胡晋红, 蔡湊, 计一平. 贮脂细胞内的信号传导分子. 世界华人消化杂志 2001;9:805-807
- 34 Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-140
- 35 Flisiak R, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D. Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis. *Cytokine* 2000;12:677-681
- 36 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000;32:247-255
- 37 刘芳, 刘金星. 转化生长因子  $\beta 1$  在肝纤维化中的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:86-88
- 38 Wang X, Chen YX, Xu CF, Zhao GN, Huang YX, Wang QL. Relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  and liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1998;4:18
- 39 Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:42-48
- 40 Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta 1$ . *J Hepatol* 1999;30:48-60
- 41 Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, van Goor H, Jansen P, Benedetti A, Moshage H. Involvement of reactive oxygen species and nitric oxide radicals in activation and proliferation of rat hepatic stellate cells. *Liver* 2001;21:1-12
- 42 Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000;32:1248-1254
- 43 Arthur MJ. Fibrosis and altered matrix degradation. *Digestion* 1998;59:376-380
- 44 Gressner AM. The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 1998;292:447-452
- 45 Gong W, Pecci A, Roth S, Lahme B, Beato M, Gressner AM. Transformation-dependent susceptibility of rat hepatic stellate cells to apoptosis induced by soluble Fas ligand. *Hepatology* 1998;28:492-502
- 46 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- 47 Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF- $\kappa$ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-1683
- 48 Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, Arthur MJ, Hughes T, Bahr MJ, Degitz K, Mann DA. Persistent activation of nuclear factor- $\kappa$ B in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IkappaB family proteins. *Hepatology* 1999;30:761-769
- 49 Lemmer ER, delaMotte-Hall P, Omori N, Omori M, Shephard EG, Gelderblom WC, Cruse JP, Barnard RA, Marasas WF, Kirsch RE, Thorgeirsson SS. Histopathology and gene expression changes in rat liver during feeding of fumonisin B1, a carcinogenic mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis* 1999;20:817-824
- 50 Saile B, Matthes N, Knittel T, Ramadori G. Transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha inhibit both apoptosis and proliferation of activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:196-202
- 51 Trim N, Morgan S, Evans M, Issa R, Fine D, Afford S, Wilkins B, Iredale J. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation. *Am J Pathol* 2000;156:1235-1243
- 52 Sakaida I, Uchida K, Matsumura Y, Okita K. Interferon gamma treatment prevents procollagen gene expression without affecting transforming growth factor-beta1 expression in pig serum-induced rat liver fibrosis in vivo. *J Hepatol* 1998;28:471-479
- 53 Liu P, Liu C, Xu LM, Hu YY, Xue HM, Liu CH, Zhang ZQ. Effects of Fuzheng Huayu 319 recipe on liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1998;4:348-353
- 54 Cai DY, Zhao G, Chen JC, Ye GM, Bing FH, Fan BW. Therapeutic effect of Zijin capsule in liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 1998;4:260-263
- 55 孙玉凤, 姚希贤, 蒋树林. 肝纤维化的中医中药治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:686-687
- 56 杜荔菁, 唐望先, 但自力, 张文英, 李绍白. 中药肝炎平防治肝纤维化的实验研究. 华人消化杂志 1998;6:21-22
- 57 蔡大勇, 陈家春, 赵刚, 叶根梅, 郝飞虹, 陈金星. 紫金胶囊防治大鼠 D-氨基半乳糖性肝损伤. 华人消化杂志 1998;6:23-26
- 58 李兵顺, 王继, 甄彦君, 王鑫国, 孙彦辉, 王淑琴, 吴中秋. 中药抑肝纤和促肝细胞生长素对大鼠免疫性肝纤维化的阻断作用. 华人消化杂志 1998;6:786-788
- 59 胡义扬, 刘成, 刘平, 顾宏图, 季光, 王晓玲. 扶正化瘀方抗 CCl<sub>4</sub>-4 大鼠肝纤维化作用与抗脂质过氧化. 新消化病学杂志 1997;5:485-486
- 60 邱德凯, 李海, 曾民德, 李继强. 虫草多糖脂质体对大鼠肝纤维化胶原酶 mRNA 变化的影响. 新消化病学杂志 1997;5:417-418
- 61 王要军, 孙自勤, 权启镇, 张志坚. 冬虫夏草与秋水仙碱抗肝纤维化的对照研究. 新消化病学杂志 1994;2:208-209
- 62 孙自勤, 王要军, 权启镇, 刘晓峰, 潘雪, 江学良. 汉防己甲素对大鼠实验性肝纤维化的防治作用. 新消化病学杂志 1994;2:19-20
- 63 王要军, 孙自勤, 权启镇, 张南坚, 刘晓峰, 江学良, 潘雪. 汉防己甲素对实验性大鼠肝纤维化 IV 型胶原及储脂细胞的影响. 新消化病学杂志 1994;2:78-79
- 64 王全楚, 申德林, 张成道, 许丽芝, 聂青和, 谢玉梅, 周永兴. 中药软肝缩脾丸对肝纤维化大鼠 TIMP-1/2 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:379-382
- 65 沈敏, 邱德凯, 陈颖, 熊伍军. 重组肝细胞再生增强因子, 丹参及苦参对大鼠纤维化细胞的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:1129-1133
- 66 Shimizu I, Ma YR, Mizobuchi Y, Liu F, Miura T, Nakai Y, Yasuda M, Shiba M, Horie T, Amagaya S, Kawada N, Hori H, Ito S. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. *Hepatology* 1999;29:149-160
- 67 崔云华, 王晓玲, 刘晴, 刘平. 丹参酸乙的抗氧化作用对大鼠肝星状细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:317-319
- 68 尤红, 王宝恩, 王泰岭, 马雪梅, 张晶. 复方 861 对肝星状细胞的增生和凋亡的干预作用. 中华肝脏杂志 2000;8:78-80

# 环氧化酶 - 2 与结直肠癌

姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟

姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科 广东省广州市 510280  
项目负责人: 姚红兵, 510280, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科. luckstar0503@163.com  
电话: 020-61643211 传真: 020-61643213  
收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2002-12-30

## 摘要

环氧化酶-2(COX-2)的过度表达与结直肠癌(CRC)的发生发展关系密切. COX-2可能通过促进肿瘤血管生成、抑制肿瘤细胞凋亡、参与氧化诱导途径、影响细胞周期变化以及导致细胞增生信号传导异常等机制参与结直肠癌的发生. 选择性COX-2抑制剂的深入研究及临床应用有望在CRC复发转移的防治及其早期病变的化学预防领域取得突破性进展.

姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟. 环氧化酶-2与结直肠癌. 世界华人消化杂志 2003; 11(9):1447-1450

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1447.asp>

## 0 引言

环氧化酶-2(COX-2)是前列腺素(PG)合成过程中一种重要的诱导酶, 人体内PG的产生主要由他催化合成. 但近年来, 国外诸多研究表明, COX-2参与了多种肿瘤的发生及发展, 尤其与结直肠癌(CRC)关系密切, 其将成为CRC防治研究的一个新靶点. 所以研究COX-2与CRC的关系具有重要意义. 本文就COX-2在CRC中的表达、在CRC发生发展及转移过程中所起作用的研究现状以及COX-2选择性抑制剂在CRC防治中应用前景作一综述.

## 1 环氧化酶-2在CRC中的表达

1.1 环氧化酶特征 环氧化酶(COX)是前列腺素合成过程中的重要限速酶, 他有两种同工酶: COX-1和COX-2. 在人二者有60%同源, 核心序列有75%同源, 尤其有催化活性的氨基酸位点在COX-1和COX-2高度保守. 但是, 他们在表达调控及定位分布方面有着明显的不同: COX-1被认为是“看家基因”, 在大多数正常细胞中都呈稳定的表达; 而COX-2被认为是“快速反应基因”, 仅在细胞受到刺激时迅速从头合成, 静息时并不表达. 他们都是完整的膜结合蛋白, 但在细胞内的定位有所不同: COX-1表达定位于内质网, 而COX-2则定位于核膜和内质网, 且在核膜的表达较内质网为强, 还可见于核内. COX-1和COX-2这些在表达调控及亚细

胞定位等方面的不同与他们各自的功能和意义是一致的. COX-1是结构型表达蛋白, 参与看家活动, 维持正常的生理功能, 如保护胃黏膜、维持肾脏血流等; COX-2则被广泛的血管内外刺激因素包括细胞因子、生长因子、肿瘤刺激物等诱导产生, 参与多种病理生理过程, 在组织损伤、炎症、细胞恶性转化时表达增加.

1.2 环氧化酶-2在CRC中表达调控 近年来流行病学、动物学实验以及细胞学实验等多方面的研究表明, COX-2在多种肿瘤中有较高的表达, 并被认为是参与了肿瘤新生血管的生成. 诱导COX-2表达的刺激因子很多, 包括细胞因子、生长因子、癌基因(如ras)、促癌剂、一氧化氮、胆汁酸、胃泌素等. 研究表明COX-2的过度表达与肿瘤的发生、发展密切相关. 许多实验证实, COX-2在CRC组织中的高表达, 主要反映在COX-2的蛋白水平及mRNA上<sup>[1-3]</sup>. Tjandrawinata et al<sup>[4]</sup>认为COX-2被激活后导致PGE<sub>2</sub>合成增加, 有利于CRC细胞的持续生长. Maekawa et al<sup>[5]</sup>检测人CRC、腺瘤性息肉和正常黏膜中COX-2 mRNA后发现, 92% (46/50)CRC组织中COX-2 mRNA含量明显增高, 而腺瘤性息肉与正常黏膜中COX-2 mRNA表达无明显差异, 也认为COX-2含量增加可能是CRC发生的早期事件. Hao et al<sup>[6, 7]</sup>研究认为结直肠息肉和腺瘤中COX-2 mRNA和蛋白水平明显高于正常组织, 但二者之间无显著性差异, 也提示COX-2是肿瘤发生的早期事件. Sheehan et al<sup>[8]</sup>研究了COX-2与Ducks的肿瘤分级的关系后认为Ducks程度越差, 肿瘤越大, 有淋巴转移的病例其COX-2表达越强. 实验研究中Oshima发现敲除COX-2基因的小鼠FAP模型其肠腺瘤形成受阻, 用COX-2抑制剂也能减少腺瘤形成<sup>[9]</sup>. 从而在遗传学上直接证明了COX-2是CRC发生的关键因素之一. 新近研究<sup>[10-14]</sup>也发现在大肠的正常黏膜、原发癌组织及转移癌组织中COX-2的表达依次增高, 且高表达的COX-2与CRC的进展分期相关, 进一步证明了COX-2可能参与了CRC的肿瘤发生及发展.

## 2 环氧化酶-2在CRC发生、发展中可能的作用机制

2.1 促进肿瘤血管形成及侵袭转移 研究显示, COX-2主要表达在新生的血管内皮细胞及与血管生成有关的细胞, 周边已存在的血管则表达COX-1而无COX-2的表达<sup>[15]</sup>. COX-2促血管生成也是CRC侵袭转移的因素之一. 有研究发现COX-2和VEGF表达基本一致, 且



其增高幅度与恶性程度相关<sup>[16]</sup>. 表明 COX-2 通过影响 VEGF 参与了肿瘤新生血管的生成. COX-2 在肿瘤中的定位研究进一步验证 COX-2 可能与肿瘤新生血管生成有关. 对结肠癌等鳞癌的研究表明, 除了肿瘤细胞表达 COX-2 外, 肿瘤及其邻近的新生血管均有 COX-2 的表达<sup>[17]</sup>. 可见, COX-2 除在癌细胞表达外, 更主要表达于肿瘤的新生血管. 有资料证实, COX-2 的确可使肿瘤中 VEGF 表达上调, 抑制 COX-2 则可抑制 VEGF 的表达<sup>[18, 19]</sup>. 与不表达 COX-2 的 CRC 细胞系 CaCo-2 比较, Tsujii et al<sup>[20]</sup> 发现表达 COX-2 的 CaCo-2 存在金属蛋白酶 -2 (MMP-2) 的激活和膜金属蛋白酶的 mRNA 水平增加, 侵袭性增加, 结果认为 COX-2 激活增加了癌细胞侵袭能力. Masunaga et al<sup>[21]</sup> 研究发现 COX-2 还可上调基质金属蛋白酶的表达, 降解细胞外基质, 并上调肿瘤相关血管因子的表达, 促进肿瘤血管形成而增加其侵袭及转移活性, 不利于预后. Chen et al<sup>[22]</sup> 用免疫组化检测的 17 例有肝转移的结肠癌中, 14 例在原发灶有比正常肠黏膜明显增高的 COX-2 表达, 且他们的肝转移灶 COX-2 的表达则几乎都较原发灶更高, 提示 COX-2 参与了肿瘤的侵袭、转移. Cianchi et al<sup>[23]</sup> 应用免疫组化方法发现 COX-2 与 VEGF 明显相关, 且二者在 CRC 组织中表达较正常黏膜增高, 提示 COX-2 在 CRC 中与肿瘤的血管生成相关, VEGF 可能是 COX-2 促进肿瘤血管生成通路的重要中介之一. 上述研究资料表明 COX-2 通过促进肿瘤新生血管生成而参与 CRC 的发生, 提示 COX-2 高表达的 CRC 癌细胞可能更具侵袭性, COX-2 有促进肿瘤侵袭和转移的潜能. 但也有研究者采用 COX-2/COX-1 值作为 COX-2 指数来描述 COX-2 表达水平, 发现 COX-2 在直径较大或侵袭较深的癌中值较高, 但与是否有转移无明显相关<sup>[24]</sup>.

2.2 抑制肿瘤细胞凋亡 Sheng et al<sup>[25]</sup> 在对表达 COX-2 的 CRC 细胞株 HCA-7 研究发现, COX-2 的诱导产物 PGE<sub>2</sub> 抑制 SC-58125 所致的程序性细胞死亡(PCD), 诱导 Bcl-2 表达, 说明 COX-2 可通过 Bcl-2 抑制细胞凋亡. Orlov et al<sup>[26]</sup> 也认为 COX-2 产物 PGE<sub>2</sub> 和其他 PG 类物质可使细胞间 cAMP 浓度增加, 抑制细胞凋亡. 并且实验中已证实 COX-2 抑制剂可以降低细胞分裂, 增加细胞的凋亡<sup>[27]</sup>.

2.3 参与氧化诱癌途径 Levy<sup>[28]</sup> 认为 COX 过氧化酶活性是非特异的, 除了产生 PGE 外, 还可产生其他作为供电子基团的过氧化物. 许多致癌物如多环芳烃类、黄曲霉素、氯化杀虫剂、芳香胺和酚类物质都能被 COX 激活成为携带电子的活化物, 通过电子与 DNA 结合成为 DNA- 致癌物结合物. COX 的另一条致癌途径是产生 malondialdehyde (MDA), 这是一种在细菌和哺乳动物鼠的实验模型中能形成多种脱氧核苷酸结合物的致癌物. MDA 来源于 COX 的非酶和酶的降解产物. MDA 还能在

脂质过氧化反应中形成. Watson et al<sup>[29]</sup> 研究也认为结肠上皮持续表达 COX 能催化产生 MDA. COX 的第三条致癌途径是形成过氧化自由基作为中间激活物, 干扰脂质过氧化反应或金属脂蛋白参与的不饱和脂肪酸的过氧化反应, 环化前致癌物中的双链, 从而形成致癌物.

2.4 影响细胞周期的变化 DuBois et al<sup>[30]</sup> 研究中结肠上皮细胞持续表达 COX 时存在明显的 G<sub>1</sub> 期延迟, 而且 CyelinD1 蛋白激酶, Rb1 激酶和细胞周期依赖激酶 (CDK4) 活性明显下降, 这样通过减慢细胞周期, 阻止凋亡, 有利于延长细胞生存期, 增强对胞外基质的黏附. 而异常延长的生存期则利于向肿瘤方向发展, 促进一系列基因突变, 促使肿瘤生成.

2.5 导致细胞增生信号传导异常 Sano et al<sup>[31]</sup> 用 Northern 杂交分析发现 TGF- $\beta$  的 mRNA 水平增加, 并且与 COX-2 增加相关. 慢性 TGF- $\beta$  刺激也能使鼠结肠上皮细胞系 RIE-1 表达 COX-2, 提示 TGF- $\beta$  能调控 COX-2 的表达. Vadlamudi et al<sup>[32]</sup> 研究认为 CRC 细胞表达高水平的 HER<sub>2</sub> 和 HER<sub>3</sub> 受体, 神经分化因子(NDF)通过增加酪氨酸磷酸化和促 HER<sub>2</sub> 与 HER<sub>3</sub> 异二聚体的形成, 激活 COX-2 mRNA 和 COX-2 蛋白, 促进 PGE 生成. NDF 促 CRC 细胞在缺乏细胞基质的 milieu 存活并具有侵袭性. Ramsay et al<sup>[33]</sup> 的研究中, 转录因子 C-myb 能激活 COX-2 转录. Kojima et al<sup>[34]</sup> 发现黏多糖(LPS)可通过核转录因子 NK- $\kappa$ B 的激活, 促进 CRC 中 COX-2 mRNA 的表达, PGE<sub>2</sub> 产生增加.

### 3 COX-2 选择性抑制剂在 CRC 防治研究中的应用

诸多的研究都为 COX-2 在 CRC 的发生、发展中的重要作用提供了有力的证据, COX-2 将成为 CRC 防治研究的一个新靶点. 目前复发转移仍是影响 CRC 患者生存率的主要原因, 也是 CRC 研究中亟待解决的难题. Tomozawa et al<sup>[35]</sup> 研究了进展期 CRC 患者的 COX-2 表达及其与患者临床病理转归的关系, 发现高表达 COX-2 与 CRC 复发明显相关, 尤其易发生血行转移, 并可被 COX-2 特异性抑制剂所抑制<sup>[35-38]</sup>. Hao et al<sup>[6, 39, 40]</sup> 研究也发现选择性 COX-2 抑制剂可抑制结肠腺瘤和腺癌的产生和转移. Oshima<sup>[9]</sup> 的实验证明在结肠息肉和 CRC 的治疗预防中, COX-2 选择性抑制剂能成为候选药物之一. 实验中已证实 COX-2 抑制剂可以降低细胞分裂, 增加细胞的凋亡<sup>[41-43]</sup>, 并有抗血管增生作用<sup>[15, 44]</sup>. 新近的一些研究资料为今后临床开发应用选择性 COX-2 抑制剂早期防治结直肠癌及其复发转移提供了科学的依据<sup>[45, 46]</sup>. 也提示选择性 COX-2 抑制剂不仅有望成为有效的 CRC 及其癌前病变二级预防药物之一, 更重要的意义在于其可能对 CRC 的复发转移具有重要的临床治疗价值. 因此, 选择性 COX-2 抑制剂的深入研究及临床应用有望在 CRC 复发转移的防治及其早期病变的化学预防领域取得突破性进展, 这也必将为 CRC 复发转移的临床治疗开创新的思路和途径.

## 4 参考文献

- 1 Tsunozaki H, Yoshinaga K, Kumagai J, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 overexpression in colorectal cancer is associated with non-polypoid growth. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32: 167-171
- 2 Hasegawa K, Ichikawa W, Fujita T, Ohno R, Okusa T, Yoshinaga K, Sugihara K. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in human colorectal adenomas. *Eur J Cancer* 2001;37:1469-1474
- 3 Chapple KS, Scott N, Guillou PJ, Coletta PL, Hull MA. Interstitial cell cyclooxygenase-2 expression is associated with increased angiogenesis in human sporadic colorectal adenomas. *J Pathol* 2002;198:435-441
- 4 Tjandrawinata RR, Dahiya R, Hughes-Fulford M. Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by Prostaglandin E<sub>2</sub> in human prostatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 1997;75:1111-1118
- 5 Maekawa M, Sugano K, Sano H, Miyazaki S, Ushima M, Fujita S, Gotoda T, Yokota T, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Increased expression of cyclooxygenase-2 to-1 in human colorectal cancers and adenomas, but not in hyperplastic polyps. *Jpn J Clin Oncol* 1998;28:421-426
- 6 Hao XP, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, Macloof J, Polak JM, Knight S, Talbot IC. Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999;187:289-301
- 7 Shattuck-Brandt RL, Lamps LW, Heppner Goss KJ, DuBois RN, Matrisian LM. Differential expression of matrilysin and cyclooxygenase-2 in intestinal and colorectal neoplasms. *Mol Carcinog* 1999;24:177-187
- 8 Sheehan KM, Sheahan K, O' Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray FE. The relation ship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. *JAMA* 1999;282:1254-1257
- 9 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803-809
- 10 Zhang H, Sun XF. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with advanced stages of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1037-1041
- 11 Elder DJ, Baker JA, Banu NA, Moorghen M, Paraskeva C. Human colorectal adenomas demonstrate a size-dependent increase in epithelial cyclooxygenase-2 expression. *J Pathol* 2002;198:428-434
- 12 Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716
- 13 Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:19-27
- 14 Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999;79:1469-1477
- 15 Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 2000;60:1306-1311
- 16 Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Stearns ME, Holland JF, Claffey K, Levine AC. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:687-694
- 17 Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ 3rd. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;59:987-990
- 18 Uefuji K, Ichikura T, Shinomiya N, Mochizuki H. Induction of apoptosis by JTE-522, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, in human gastric cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000;20: 4279-4284
- 19 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:135-138
- 20 Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-3340
- 21 Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, Ohno S, Shibakita M, Kinugasa S, Yoshimura H, Tachibana M, Kubota H, Nagasue N. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000;6:4064-4068
- 22 Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer* 2001;91:894-899
- 23 Cianchi F, Cortesini C, Bechi P, Fantappie O, Messerini L, Vannacci A, Sardi I, Baroni G, Boddi V, Mazzanti R, Masini E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2001;121:1339-1347
- 24 Fujiti T, Matsui M, Takaku K, Uetake H, Ichikawa W, Taketo MM, Sugihara K. Size and invasion-dependent increase in cyclooxygenase-2 levels in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:4823-4826
- 25 Sheng HM, Shao JY, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E<sub>2</sub> in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-366
- 26 Orlov SN, Thorin-Trescases N, Dulin NO, Dam TV, Fortuno MA, Tremblay J, Hamet P. Activation of CAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3. *Cell Death Differ* 1999;6:661-672
- 27 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952
- 28 Levy GN. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J* 1997;11:234-247
- 29 Watson AJ. Chemopreventive effects of NSAIDs against colorectal cancer: regulation of apoptosis and mitosis by COX-1 and COX-2. *Histol Histopathol* 1998;13:591-597
- 30 DuBois RN, Shao JY, Tsujii M, Sheng H, Beauchamp RD. G1 Delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res* 1996;56:733-737
- 31 Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-3789
- 32 Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J, Kumar R. Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER<sub>2</sub> receptor. *Oncogene* 1999;18:305-314
- 33 Ramsay RG, Friend A, Vizantios Y, Freeman R, Sicurella C, Hammett F, Armes J, Venter D. Cyclooxygenase-2, a colorectal cancer nonsteroidal anti-inflammatory drug target, is regulated by c-MYB. *Cancer Res* 2000;60:1805-1809
- 34 Kojima M, Morisaki T, Lzuhara K, Uchiyama A, Matsunari Y, Katano M, Tanaka M. Lipopolysaccharide increase cyclo-oxygenase-2 expression in a colon carcinoma cell line through nuclear factor-kB activation. *Oncogene* 2000;19:1225-1231
- 35 Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H. Cyclooxygenase-2 over expression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83:324-328
- 36 Tomozawa S, Nagawa H, Tsuno N, Hatano K, Osada T,

- Kitayama J, Sunami E, Nita ME, Ishihara S, Yano H, Tsuruo T, Shibata Y, Muto T. Inhibition of haematogenous metastasis of colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522. *Br J Cancer* 1999;81:1274-1279
- 37 Lynch PM. COX-2 inhibition in clinical cancer prevention. *Oncology (Huntingt)* 2001;15:21-26
- 38 Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 2001;1:11-21
- 39 Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sawaoka H, Kimura Y, Shiozaki H, Hori M. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999;94:451-455
- 40 Li G, Yang T, Yan J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:886-890
- 41 Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000;342:1946-1952
- 42 Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C. Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res* 1997;3:1679-1683
- 43 Grossman EM, Longo WE, Mazuski JE, Panesar N, Kaminski DL. Role of cytoplasmic and secretory phospholipase A2 in intestinal epithelial cell prostaglandin E2 formation. *Int J Surg Investig* 2000;1:467-476
- 44 Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1589-1594
- 45 Yamauchi T, Watanabe M, Kubota T, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kabeshima Y, Yorozya K, Yamamoto K, Mukai M, Kitajima M. Cyclooxygenase-2 expression as a new marker for patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002;45:98-103
- 46 Hull MA, Fenwick SW, Chapple KS, Scott N, Toogood GJ, Lodge JP. Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:21-27

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消 息 •

## WJG 搭建我国消化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology® (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、Hp 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和定量的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视。当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(*Index Medicus* / MEDLINE)收录。WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 [www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com) 上供国际和国内消化病学者免费使用。WJG 是惟一全面反映我国消化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 [www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com) 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病学研究成果的快速发展。

(世界胃肠病学杂志社)

# 幽门螺杆菌疫苗的研究进展

姜 政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙

姜政, 陶小红, 王丕龙, 重庆医科大学第一附属医院消化科 重庆市 400016  
黄爱龙, 重庆医科大学肝炎研究所 重庆市 400010  
项目负责人: 姜政, 400016, 重庆市渝中区医学院路 1 号, 重庆医科大学第一附属医院消化科. jzho53@mail.china.com.  
电话: 023-68891218  
收稿日期: 2002-10-18 接受日期: 2002-11-20

## 摘要

幽门螺杆菌是人类最常见的致病菌,也是人类第一类致癌原,他的感染不但与胃肠道疾病有直接关系,而且与肠外疾病的发生也有重要的关系. Hp感染是一种慢性、持续性感染,通过慢性炎症免疫反应、毒素的释放、炎症递质的增多以及自由基的生成,引起感染局部和远处损害,从而导致或加重了胃肠疾病以及肠道外其他系统的疾病. 近年来,随着对 Hp 致病机制进一步认识,根除 Hp 与胃肠疾病以及胃肠外疾病治疗的关系达成了广泛的共识. 目前根除 Hp 感染虽然有多种有效的药物联合治疗,但同时都存在不同程度的副作用:疗效不稳定、耐药菌株的产生以及难以解决的 Hp 复发等问题,成为了临床上治疗 Hp 相关性疾病的几大障碍. 随着分子生物学技术的发展, Hp 致病机制研究的进一步深入,通过对有效抗原的筛选、抗原释放系统的最佳选择以及基因工程菌株构建的运用,从而为 Hp 疫苗的研究与开发奠定了基础,同时为预防和根除 Hp 的感染逐步变成了现实. 实验证明, Hp 尿素酶、热休克蛋白以及粒细胞激活蛋白等都是有效的抗原成分,配以有效的释放载体,使得实验的动物不同程度地获得了预防和/或根除 Hp 的感染的能力. 现综述近年来 Hp 疫苗研究报道,为 Hp 疫苗的开发和研究进一步提供理论依据.

姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 幽门螺杆菌疫苗的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(8):1451-1456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1451.asp>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是上消化道疾病的主要致病菌,他的感染不但与 B 型胃炎、消化性溃疡、MALT 淋巴瘤和胃癌的发生有密切关系<sup>[1-19]</sup>,而且与肠道外疾病的发生也有重要关系<sup>[20-36]</sup>,已被世界卫生组织列为胃癌等恶性肿瘤发生的相关致病菌<sup>[37,38]</sup>. Hp 在我国普通人群的感染率较高达到 50-80%,并仍以每年 1-2% 的速度增加<sup>[39]</sup>,每年新增感染病例超过 1 200 万人. 根除 Hp 的感染虽然有多种有效的药物联合治疗,目前采取的方式也很多:比如药物的二联、三联以及四联疗法,既可以达到治疗消化道疾病的目的,

同时也不同程度的根除 Hp 感染. 但近年来,由于抗生素广泛的、大剂量的应用以及滥用,导致耐药菌株的产生;同时出现了一些药物副作用;患者耐受性、依从性以及承受力都受到了挑战. 鉴于此,欲求降低 Hp 感染率及其相关疾病的发生率,不少研究工作者正致力于开发新的 Hp 治疗以及预防方案: Hp 疫苗开发,现将 Hp 疫苗研究进展作一综述.

## 1 Hp 候选疫苗抗原的选择

候选疫苗的制备必需有效的抗原免疫机体,才能刺激机体产生系统的免疫应答,而后预防机体的感染. 随着 Hp 致病机制研究的深入以及分子生物学技术的发展-基因工程菌株的构建和运用,为有效抗原的筛选提供了有利条件,同时为预防和根除 Hp 感染迈出了关键的一步.

1.1 尿素酶 尿素酶基因是所有 Hp 菌株共同拥有的,编码的蛋白具有很强的尿素酶活性,尿素酶占 Hp 总蛋白量的 6%,他是含有镍离子的金属酶,能够分解尿素为  $\text{NH}_3$  和  $\text{CO}_2$ ,使 Hp 周围 pH 值增高,有利于 Hp 在低的 pH 值环境下生存. 目前发现尿素酶基因大小约为 7.5 kb,共有 9 个读码框(ORF),分别为 UreA、UreB、UreC、UreD、UreE、UreF、UreG、UreH、和 UreI. 其中 UreA、UreB 为尿素酶的两个结构亚单位,具有高度的保守性,是 PCR 检测 Hp 感染常选择的的目的基因以及基因疫苗的候选基因. 实验证明,剔除尿素酶基因表达的 Hp,在无菌乳猪感染模型中, Hp 感染后不能定植于胃内,这充分证明尿素酶的致病作用;而且能激活单核吞噬细胞和刺激炎症细胞因子的产生,介导胃黏膜上皮炎症反应和空泡形成<sup>[40]</sup>,也导致胃黏膜上皮的增生与凋亡失衡,增生指数(LI)/凋亡指数(AI)明显增高,导致癌前病变的发生,同时在体外仍然对胃上皮细胞有毒力作用. 另外铵离子会干扰胃黏膜的正常  $\text{H}^+$  反渗,导致组织损伤,细菌过度的生长,硝酸盐降解为亚硝酸盐及亚硝胺而致癌. 因此,尿素酶既是定植因子,又是毒力因子<sup>[41]</sup>. 虽然尿素酶对 Hp 的定植和致病起着重要的作用,但由于其主要活性部分位于菌体表面、含量丰富、广泛表达、高度保守、其大分子量和颗粒状结构有利于黏膜免疫接种,因此,尿素酶分子是作为疫苗抗原的合理选择<sup>[42,43]</sup>. 同时在体内, Hp 表面具有黏附胞质蛋白的特性,能够将自溶释放的尿素酶黏附到活菌表面,这给 Hp 疫苗的研究又提供了一重要的理论依据.

大量的文献报道,用重组的尿素酶亚单位 B(rUreB)口服免疫预先感染了 Hf 小鼠,结果发现免疫的小鼠不仅彻底清除了 Hf 感染,而且能够预防小鼠再次感染;Kleanthous et al<sup>[44]</sup>用重组的尿素酶亚单位 B(rUreB)加上大肠杆菌热不稳定毒素(LT)作为黏膜佐剂免疫小鼠,与对照组相比,结果发现:免疫组胃内 Ure 活性显著降低,且胃黏膜组织 Hp 定量培养显示, Hp 减少 97% 以上; Michetti et al<sup>[45]</sup>对口服不同剂量(180 mg、60 mg、20 mg, 4 次/d)的尿素酶与 LT(5  $\mu$ g)安全性和免疫原性进行了研究,结果发现:所有的志愿者都能够耐受,且能够减少胃内 Hp 的定植,从而减轻了胃炎的程度; Saldinger et al<sup>[46]</sup>采用 rUreB 结合霍乱毒素(CT)免疫感染了 Hf BALB/c 小鼠,结果发现免疫 BALB/c 小鼠全部清除了 Hf,进一步研究表明,脾脏 CD4<sup>+</sup>T 细胞增生,血清中 IgG<sub>1</sub> 增加,同时伴随 IL-4 的增高,  $\gamma$ -干扰素的减少,从而推测 rUreB 可能诱导了 Th-2 CD4<sup>+</sup>T 细胞增生,有助于 Hp 的根除.有学者对 Hp 感染志愿者进行了 I - II 期临床实验,用 Ure 结合 LT 免疫后,同样发现 Hp 感染的密度显著减少; Lee et al<sup>[47]</sup>对非人灵长类进行的类似研究也表明,通过减少胃内 Hp 的密度,有助于减轻胃炎的程度.然而, Solnick et al<sup>[48]</sup>报道,用尿素酶口服和肌肉注射免疫类人猿,而后进行 Hp 攻击,结果发现:虽然能够诱导体液免疫,但是所有给与 Hp 攻击的类人猿都感染了 Hp,而且细菌密度在实验组和对照组中没有统计学差异.上述结果显示, Hp 疫苗有待于进一步研究.为了获得较好的免疫效果,因而建议多种抗原成分联合起来制作疫苗.

1.2 空泡毒素 由 VacA 基因所表达, VacA 基因存在于所有 Hp 菌株的基因组中,目前发现 VacA 至少存在 4 个不同信号区(sla、slb、slc、s2)和 3 个不同的中间区(ml、m2a、m2b). VacA 由一个信号区及一个中间区组成,因此 VacA 有多种不同的组合体.不同的组合体其空泡毒性有极大的差异,因此,导致胃、十二指肠疾病的关系也存在极大的差异.所表达的活性毒素可在 loop 区降解而产生两个分子量分别为 37 kD、58 kD 的亚单位,一般认为, 37 kD 亚单位为 VacA AB 型结构毒素的 A 亚单位,是毒素亚单位;而 58 kD 亚单位则为 B 亚单位,主要是与靶细胞结合的亚单位.在体外,只有 50-60% Hp 产生具有活性的 VacA.研究认为, VacA 毒素能黏附靶细胞,并被靶细胞内化,在细胞内表达而产生空泡作用;也有研究认为, VacA 可能是通过作用于细胞膜上的 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶,影响离子转运而引起细胞的空泡样变性;有文献报道, VacA 毒素能够抑制表皮生长因子(EGF)与其受体的结合,从而引起酪氨酸磷酸化,扰乱了上皮细胞的信号传导,使上皮损害<sup>[49]</sup>;研究还表明,去毒的空泡毒素(VacA)免疫小鼠,能够使小鼠免受产 VacA 毒素的 Hp 感染. Ghiara et al<sup>[50]</sup>应用 rVacA 和 CagA 作为抗原与 LTK63 黏膜佐剂免疫小鼠,结果该疫苗成功地根除了小鼠 Hp 的感染,从而

认为以 VacA 和 CagA 为基础的抗原疫苗对小鼠慢性 Hp 感染具有确切的治疗和预防作用,这为该疫苗应用于人类的临床研究奠定了基础.

1.3 CagA 蛋白 CagA 基因也称为细胞毒素相关基因,其表达产物为 CagA 蛋白.后者为 120-128 kD 高分子的蛋白,是 Hp 产生的另一重要毒力因子.具有 CagA 基因的 Hp 几乎都表达 CagA 蛋白并产生可测的抗体反应.据文献报道, CagA 阳性菌株能够直接或间接(通过 NF- $\kappa$ B)诱导胃上皮细胞 IL-8 的分泌,而 IL-8 在中性粒细胞趋化和激活过程中起重要作用,导致胃黏膜的损伤.动物实验发现, CagA 基因和 CagA 蛋白与胃炎、消化性溃疡、尤其胃癌的发生有良好的相关性<sup>[51]</sup>.在 CagA 阳性的 Hp 菌株中还发现某些 Hp 染色体上存在特定的 DNA 区域,与致病相关,具有致病岛特征,称之为 Cag 致病岛(pathogenicity island, PAI). Cag PAI 约 4 万 bp 的 DNA 片段,含有 30 多个基因,依次命名为 CagA、CagB、CagC...CagT 等. Cag PAI 部分基因序列与一些已知致病毒力基因序列有高度同源性,所以提示 Cag PAI 是 Hp 主要毒力因子.关于 Cag PAI 多态性、致病性与其疫苗正在探讨中.

1.4 中性白细胞激活蛋白(NAP) NAP 是一种铁蛋白,编码他的 NAPn 基因几乎在所有 Hp 中检测到,但是在体外表达的 NAP,其活性存在很大差异.他能够通过 CD11a/CD18 和 CD11b/CD18 与 ICAM-1 相互作用而使白细胞黏附内皮细胞;选择性地与中性白细胞的酸性糖鞘脂相结合而调节白细胞的功能;与粘蛋白相结合,为 Hp 定植于胃黏膜上皮细胞埋下了伏笔,因此, NAP 在其黏附和致病过程中起重要作用<sup>[52]</sup>.进一步研究发现, NAP 也是一种 Hp 疫苗的候选抗原, rNAP 免疫小鼠能够使小鼠获得免疫力. Satin et al<sup>[53]</sup>采用 Hp NAP 接种小鼠,能够诱导体液免疫,使小鼠对 Hp 具有免疫力,但同时发现 Hp NAP 对淋巴细胞等具有化学趋化作用,导致炎症细胞在 Hp 感染部位聚集,同时激活 NADPH 氧化酶,产生一些氧自由基,导致机体的损害.

1.5 热休克蛋白 60(HSP60) 热休克蛋白家族有 HspA、B、Hsp60、Hsp70 等,研究发现,这些蛋白质中 Hsp60 和 HopZ(Hp outer membrane protein Z)与 Hp 的黏附有关, Hp 热休克蛋白 HspA、HspB,分别同源于大肠杆菌的 GroEs 和 GroEl.体外实验表明,热休克蛋白可增强尿素酶的活性作用,同时与自身免疫性反应相关,这样就有可能产生有害的自身反应性抗体,动物实验还证明,以热休克蛋白喂养小鼠可引起冠状动脉粥样硬化<sup>[54]</sup>,但用其免疫动物能够使动物获得对 Hp 的免疫力. Todoroki et al<sup>[55]</sup>制备了编码热休克蛋白 A、B 的 DNA (pcDNA3.1-hspA 和 pcDNA3.1-hspB)疫苗,对 C57BL 小鼠进行皮下接种,采用 pcDNA3.1-hspA 接种的 C57BL 小鼠产生了 IgG2a, pcDNA3.1-hspB 则产生 IgG1/IgG2a,他们都显著地减少 Hp 在胃内的定植,同时减轻因 Hp 存在的炎症反应.因而,作者认为:以热休克



蛋白为基础的 DNA 疫苗不失为一种有效的 Hp 疫苗.

1.6 黏附蛋白 1993 年, Evans et al 发现, 在 Hp 上存在一种原纤维样血凝素(NLBH)能与红细胞紧密结合, 并通过血凝抑制试验证实 N-乙酰神经氨酸乳糖是其受体的主要成分, 随后克隆了相应的基因 HpaA, 发现基因长度约为 1.4 kb, 存在 3 个读码框(ORF), 其中 ORF<sub>2</sub> 长度为 549 bp, 是 NLBH 的主要结构基因 -HpaA. 后来有学者<sup>[56]</sup>提出异议, 认为 HpaA 长为 783 bp, 包含了 Evans 所述的 ORF<sub>2</sub> 和 ORF<sub>3</sub>, 编码 2.9 万的蛋白质, 我国学者<sup>[57]</sup>通过克隆并序列分析证实 HpaA 长为 783 bp, 编码 261 个氨基酸残基, 在大肠杆菌中表达具有良好的抗原性. Hp 黏附蛋白对 Hp 的定植和致病起着重要的作用. Chen et al<sup>[58]</sup>报道, 采用 rHpaA 进行体外实验, rHpaA 能够被 Hp 阳性患者血清识别, 同时能够刺激外周不同的 Th 细胞增生, 更重要的是 rHpaA 能够增加 Th<sub>2</sub> 细胞的比例, 而且发现 rHpaA 和抗 HpaA 能够抑制 Hp 在胃黏膜上黏附. 因此, 作者认为 rHpaA 可能将成为 Hp 一种新的候选抗原. Kim et al<sup>[59]</sup>构建重组质粒编码 HpaA 和霍乱毒素 CTXA2B 基因, 在大肠杆菌中表达, 经过纯化口服免疫小鼠, 结果发现: 重组融合蛋白能够提高黏膜的 IgA 以及血清中 IgG 的含量, 同时使 62.5 % 的小鼠具有预防 Hp 感染的能力.

1.7 全菌抗原 Doidge et al 用 Hp 超声粉碎抗原和黏膜免疫佐剂口服免疫小鼠, 使感染的小鼠不仅清除了体内的 Hp, 同时获得了预防 Hp 再感染的能力. 但全菌抗原成分复杂, 副反应多, 而且存在由交叉反应引起一系列不良反应的可能性, 然而用单一的抗原, 免疫原性太弱, 故多采用 2-3 种不同的抗原联合应用以克服上述两种疫苗的不足之处, 以期待获得更广泛地预防和免疫治疗作用的疫苗. Kotloff et al<sup>[60]</sup>采用灭活的 Hp 全菌和免疫佐剂口服免疫有或没有临床症状志愿者, 结果发现能够同时诱导黏膜和体液免疫. Goto et al<sup>[61]</sup>用全菌超声破碎液加霍乱毒素以不同的剂量口服免疫 C57BL/6, 而后用活的 Hp 进行攻击, 通过对胃黏膜炎症反应程度观察、唾液以及粪便中 IgA 检测、Hp 定植程度等研究, 发现全菌超声破碎液能够刺激黏膜免疫, 使 90-100 % Hp 定植受到了抑制, 所有被保护的小鼠胃黏膜都表达  $\gamma$ -干扰素, 50 % 小鼠还表达 IL-4、IL-5, 但同时发现免疫后小鼠胃炎程度比免疫前更严重, 作者认为可能与免疫有关. Ikewaki et al<sup>[62]</sup>对持续 Hp 感染小鼠进行 Hp 全菌超声破碎液加 CT 免疫, 通过细菌培养、组织学检测, 结果发现: 62.5 % 的小鼠根除了 Hp, 有趣的是单用 CT 免疫的小鼠, 47.1 % 消除了 Hp 的感染, 同时还发现唾液以及粪便中 IgA、胃黏膜 IL-4 表达也是增高的, 这可能与 Th<sub>2</sub> 细胞的激活有关.

## 2 Hp 候选疫苗佐剂的选择

为了解决蛋白质疫苗普遍存在抗原性弱的问题, 以往常配以黏膜佐剂, 而霍乱毒素(CT)和大肠杆菌热敏毒素(LT)是目前研究最为深入的黏膜免疫佐剂, 可促进

抗原呈递细胞的抗原呈递, 刺激 Th<sub>2</sub> 型黏膜免疫, 活化 Th<sub>2</sub> 细胞免疫途径, 促进上皮细胞内淋巴细胞的有丝分裂和 B 细胞种型分化, 克服了因抗原的免疫耐受而起免疫促进作用. 虽然口服疫苗是一种较为理想的免疫接种途径, 但实验表明, 口服黏膜佐剂可产生不同程度的副作用, CT 可诱生超敏反应以及 LT 的毒力所致腹泻等不耐受症状. 经过不断的探索和研究, 目前开发了更为安全而有效的黏膜免疫佐剂.

2.1 霍乱毒素(cholera toxin, CT) CT 是一种强有力的免疫佐剂, 其作用机制是通过抑制口服抗原的免疫耐受而发挥免疫促进作用, 但由于毒性作用的存在 - 超敏反应等, 使他的应用受到了一定的限制. 研究发现, 具有两个亚基 A<sub>2</sub>、B 的 CT, 通过生物学的改造后, 具有毒副作用小的特点, 因而得到了广泛的应用. CT-B 具有增强免疫作用, 目前认为 CT-B 是至今为止最有效最安全的黏膜免疫佐剂之一, 多数研究学者将 CT-B 与 Hp 的重组抗原结合起来免疫小鼠, 可使小鼠获得免疫力.

2.2 大肠杆菌热敏毒素(LT) 目前最受青味的黏膜免疫佐剂是 LT-B, 因为 LT-B 比 CT-B 拥有更可靠的安全性和有效性. 实验发现, 与 Hp 的重组抗原结合, 免疫小鼠几乎不出现副作用. Pizza et al<sup>[63]</sup>报道: CT 和 LT 虽然是强的免疫佐剂, 但在人体实验中发现, 具有很大的副作用. 目前, 通过大量的实验研究, 将 LT 的 A 亚单位第 63 位的赖氨酸被丝氨酸取代, 开发出无毒副作用的 LTK63, 以及第 72 位的精氨酸被丙氨酸取代保留了部分酶活性 LTR72, 二者都具有黏膜免疫佐剂的作用, 与有效的抗原一起, 刺激机体产生强的免疫力.

## 3 Hp 候选疫苗释放系统的选择

某些载体(细菌或质粒), 经过分子生物学改造以后, 具有无比的优越性 - 独特的安全性和免疫佐剂的作用而受到科学家们的关注.

3.1 真核表达载体 pcDNA3.1(+) 核酸疫苗(DNA 疫苗)是 1990 年初发展起来的一种全新的第三代疫苗, 因其不仅能诱导体液免疫及细胞免疫, 而且还具有容易构建与改造, 制备工艺简单等传统疫苗难以比拟的优点, 而受到普遍重视. 据文献报道, 注入的 DNA 可以达到机体的其他部位, 且能被多种细胞摄取 DNA 质粒, 而进入细胞, 这为 DNA 疫苗奠定了基础. pcDNA3.1(+) 作为研究工具, 将 Hp 候选抗原基因克隆至 pcDNA3.1(+), 探讨其在真核细胞表达的情况. 实验结果表明, Hp 候选抗原能在真核细胞中表达, 并能使接种的动物获得对 Hp 的免疫力. 国内外已报道了 Hp UreB 及 HspA2B 核酸疫苗的构建, 初步证明了其免疫原性及免疫保护作用<sup>[65]</sup>.

3.2 减毒的沙门菌 Koesling et al<sup>[64]</sup>采用重组的尿素酶 A、B 的减毒沙门菌(SL3261[pYZ97])单剂量口服免疫 BALB/c、C57BL/6 小鼠, 能够产生持久的免疫力, 攻击实验表明, 重组减毒沙门菌疫苗既能够预防 Hp 感染, 而且能够治疗 Hp 的感染. Bumann et al<sup>[65]</sup>研究发现, 尿素酶能够在重组减毒沙门菌 Ty21a(pDB1)中表达, 同时

对9位志愿者和3位志愿者分别接种了Ty21a(pDB1)和Ty21a, 结果发现: 没有严重的副作用发生, 12位志愿者中有10位针对沙门菌产生了体液免疫反应, 3位产生了针对尿素酶的T细胞的免疫反应, 因此作者认为重组减毒沙门菌疫苗是以T细胞介导的保护性的免疫反应. Liao et al<sup>[66]</sup>探索了表达Hp过氧化氢酶的减毒沙门菌疫苗(SL3261)的作用, 通过口服, 将其免疫C57BL/6小鼠, 随后给予Hp悉尼菌株攻击, 结果发现: 该疫苗能诱导有效地免疫反应, 预防和治疗Hp的感染. 通过以上实验说明, 减毒沙门菌不仅是一种有效的免疫载体, 而且能刺激细胞免疫和诱导体液免疫.

**3.3 乳酸杆菌** 研究表明, 乳酸杆菌是肠道的正常菌群, 同时可以作为一种载体表达菌, 它能够表达Hp的各种成分. Lee et al<sup>[67]</sup>报道, 通过将Hp尿素酶基因克隆至载体pTREX1, 转染乳酸杆菌, 而后表达尿素酶, 构建了乳酸杆菌MG1363疫苗, 可溶性表达尿素酶, 占菌体总量的6.25%, 以不同剂量、方案口服免疫C57BL/6, 结果发现: 乳酸杆菌MG1363疫苗能够诱导体液免疫而起保护作用.

**3.4 卡介苗(BCG)** 以往主要用于预防结核菌的感染, 由于是活载体及其独特的安全性和免疫佐剂作用而近来受到科学家们的关注, 经过分子生物学改造以后, 已构建出能在BCG中表达外源基因的大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒. 现研究表明: 重组BCG(rBCG)能够表达IL-12、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、HCG- $\beta$ , 且能被机体识别, 可用于人类的生物治疗. 重组BCG技术已经作为一种分子生物学技术广泛用于疫苗、肿瘤、治疗等领域<sup>[68-79]</sup>. 具有其他疫苗载体不可比拟的优越性, 即毒副作用小、安全、生产工艺简单, 不需要纯化, 成本低, 本身就是很强的免疫佐剂, 一次性接种, 终身带菌, 可使机体产生长期的细胞免疫和体液免疫, 因而该疫苗是一种理想、高效、特异的疫苗, 他将预防和治疗于一体. 如果外源基因在BCG中过度表达, 还可以通过体外干预的方法终止其过度表达. 目前我们正在构建重组BCG-Hp/OMP, 以期待获得一种理想的疫苗.

#### 4 Hp疫苗的免疫保护机制

目前Hp疫苗诱导机体产生保护性免疫和治疗作用的机制仍不清楚. Saldinger et al<sup>[46]</sup>采用rUreB结合霍乱毒素(CT)免疫BALB/c小鼠, 研究发现, 脾脏CD4<sup>+</sup>T细胞增生, 血清中IgG<sub>1</sub>增加, 同时伴随IL-4的增高,  $\gamma$ -干扰素的减少, 从而推测rUreB可能诱导了Th<sub>2</sub> CD4<sup>+</sup>T细胞增生, 有助于Hp的根除. Ghiara et al<sup>[50]</sup>认为Hp疫苗可能改变了胃内Th<sub>1</sub>型应答反应, 通过Th<sub>2</sub>或Th<sub>0</sub>型起保护性反应, 而Th<sub>1</sub>型应答反应产生IFN- $\gamma$ 、IL-12等细胞因子引起黏膜的损害, 而Th<sub>2</sub>或Th<sub>0</sub>免疫应答则引起体液免疫反应, 产生S-IgA以及IL-4、IL-10等细胞因子而起免疫保护作用, 也有研究表明<sup>[80]</sup>, Th<sub>1</sub>

型免疫反应同时也参与了免疫保护机制, Th<sub>1</sub>和Th<sub>2</sub>的平衡协调可能对疫苗的保护机制更为重要. Blanchard et al<sup>[81]</sup>报道, 通过对人和动物长期的研究发现, Hp引起内在免疫反应的能力受到宿主基因框架的调节, 也就是说, 机体的免疫状态对Hp根除或者加重Hp所致的胃肠道疾病起了决定性的作用.

#### 5 Hp疫苗的未来

Hp疫苗的研究虽然取得了显著的进展, 预计将有商品化的Hp疫苗进入临床实验, 但是Hp疫苗成功地应用于人类预防和临床治疗尚有许多困难有待解决; 尚有许多工作有待深入: (1)进一步需要阐明人体感染Hp后地免疫应答和疫苗免疫保护机制, 为疫苗的设计及免疫策略提供依据; (2)进一步筛选更为有效的抗原制备疫苗和研制更完善的核酸疫苗; (3)研制更安全有效的疫苗运载释放系统及有效的免疫接种途径; (4)建立更能客观评价疫苗免疫效果的动物模型等. Hp疫苗的研制已成为全球研究的热点, 美国已将其列为21世纪疫苗优先发展的II类项目, 有人预测在2010年代, Hp疫苗将有选择地应用于人群的预防和临床治疗.

#### 6 参考文献

- 1 Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Takeshita M, Hizawa K, Kawasaki M, Yao T, Tsuneyoshi M, Iida M, Fujishima M. Predictive value of endoscopic ultrasonography for regression of gastric low grade and high grade MALT lymphomas after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001;48:454-460
- 2 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- 3 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789
- 4 Kate V, Ananthakrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001;88:1054-1058
- 5 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H. pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 6 Xia HX, Fan XG, Talley NJ. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J Gastroenterol* 1999;5:263-266
- 7 Peng ZS, Liang ZC, Liu MC, Ou-Yang NT. Studies on gastric epithelial cell proliferation and apoptosis in Hp associated gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:218-219
- 8 Xiao SD, Liu WZ. Current status in treatment of Hp infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:3-4
- 9 Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, Siepmann NY, Sugg JE, Hopkins RJ. *Helicobacter pylori* and early duodenal ulcer status post-treatment: a review. *Helicobacter* 2001;6:84-92
- 10 Casella G, Buda CA, Maisano R, Schiavo M, Perego D, Baldini V. Complete regression of primary gastric MALT-lymphoma after double eradication *Helicobacter pylori* therapy: role and importance of endoscopic ultrasonography. *Anticancer Res* 2001;21(2B):1499-1502
- 11 Hurenkamp GJ, Grundmeijer HG, Van Der Ende A, Tytgat

- GN, Assendelft WJ, Van Der Hulst RW. Arrest of chronic acid suppressant drug use after successful *Helicobacter pylori* eradication in patients with peptic ulcer disease: a six-month follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1047-1054
- 12 Guo CQ, Wang YP, Liu GY, Ma SW, Ding GY, Li JC. Study on *Helicobacter pylori* infection and p<sup>53</sup>, c-erbB-2 gene expression in carcinogenesis of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:313-315
- 13 Hiyaama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:734-739
- 14 Hu PJ. Hp and gastric cancer: challenge in the research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1-2
- 15 Quan J, Fan XG. Progress in experimental research of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1068-1069
- 16 Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, Chaumette MT, Haioun C. *Helicobacter pylori* and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuselarge B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2324-2328
- 17 Morgner A, Miehlke S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001;19:2041-2048
- 18 Zhang XQ, Lin SR. Progress in research on the relationship between Hp and stomach cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:206-207
- 19 Hua JS. Effect of Hp: cell proliferation and apoptosis on stomach cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:647-648
- 20 Armitage GC. Periodontal infections and cardiovascular disease-how strong is the association? *Oral Dis* 2000;6:335-350
- 21 Tsai CJ, Huang TY. Relation of *Helicobacter pylori* infection and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1227-1232
- 22 Gocyk W, Niklinski T, Olechnowicz H, Duda A, Bielanski W, Konturek PC, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Med Sci Monit* 2000;6:1085-1092
- 23 Tsang KW, Lam WK, Kwok E, Chan KN, Hu WH, Ooi GC, Zheng L, Wong BC, Lam SK. *Helicobacter pylori* and upper gastrointestinal symptoms in bronchiectasis. *Eur Respir J* 1999; 14:1345-1350
- 24 Caselli M, Zaffoni E, Ruina M, Sartori S, Trevisani L, Ciaccia A, Alvisi V, Fabbri L, Papi A. *Helicobacter pylori* and chronic bronchitis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:828-830
- 25 Dauden E, Jimenez Alonso I, Garcia Diez A. *Helicobacter pylori* and idiopathic chronic urticaria. *Int J Dermatol* 2000;39:446-452
- 26 Ojetti V, Armuzzi A, De-Luca A, Nucera E, Franceschi F, Candelli M, Zannoni GF, Danese S, Di-Caro S, Vastola M, Schiavino D, Gasbarrini G, Patriarca G, Pola P, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* infection affects eosinophilic cationic protein in the gastric juice of patients with idiopathic chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:66-72
- 27 Vainio E, Huovinen S, Liutu M, Uksila J, Leino R. Peptic ulcer and *Helicobacter pylori* in patients with lichen planus. *Acta Derm Venereol* 2000;80:427-429
- 28 Szlachcic A, Sliowski Z, Karczewska E, Bielanski W, Pytko-Polonczyk J, Konturek SJ. *Helicobacter pylori* and its eradication in rosacea. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:777-786
- 29 Avci O, Ellidokuz E, Simsek I, Buyukgebiz B, Gunes AT. *Helicobacter pylori* and Behcet's disease. *Dermatology* 1999; 199:140-143
- 30 Yazawa N, Fujimoto M, Kikuchi K, Kubo M, Ihn H, Sato S, Tamaki T, Tamaki K. High seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with systemic sclerosis: association with esophageal involvement. *J Rheumatol* 1998;25:650-653
- 31 Emilia G, Longo G, Luppi M, Gandini G, Morselli M, Ferrara L, Amarri S, Cagossi K, Torelli G. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001;97:812-814
- 32 Parkinson AJ, Gold BD, Bulkow L, Wainwright RB, Swaminathan B, Khanna B, Petersen KM, Fitzgerald MA. High prevalence of *Helicobacter pylori* in the Alaska native population and association with low serum ferritin levels in young adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:885-888
- 33 Konno M, Muraoka S, Takahashi M, Imai T. Iron-deficiency anemia associated with *Helicobacter pylori* gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:52-56
- 34 Annibale B, Lahner E, Bordini C, Martino G, Caruana P, Grossi C, Negrini R, Delle-Fave G. Role of *Helicobacter pylori* infection in pernicious anaemia. *Dig Liver Dis* 2000;32:756-762
- 35 Choe YH, Kwon YS, Jung MK, Kang SK, Hwang TS, Hong YC. *Helicobacter pylori*-associated iron-deficiency anemia in adolescent female athletes. *J Pediatr* 2001;139:100-104
- 36 Kaptan K, Beyan C, Ural AU, Cetin T, Avcu F, Gulsen M, Finci R, Yalcin A. *Helicobacter pylori*-is it a novel causative agent in Vitamin B12 deficiency? *Arch Intern Med* 2000;160: 1349-1353
- 37 Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y, Fujiki H. *Helicobacter pylori* membrane protein 1: a new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 2001; 61:6356-6359
- 38 Sheng T, Zhang JZ. Current situation on studies of Hp urease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:881-884
- 39 Li MF, Li Z, Ma AY, Zhao JH, Sun JX, Yu SZ, Wu XP. Cloning, expression and immunogenicity of Hp UreB gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:596-600
- 40 Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:720-741
- 41 Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, Futagami S, Nakagawa Y, Senpuku H, Kobayashi M, Takahashi H. Urease plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun* 1998;66:4832-4837
- 42 Dieterich C, Bouzourene H, Blum AL, Corthesy-Theulaz IE. Urease-based mucosal immunization against *Helicobacter heilmannii* infection induces corpus atrophy in mice. *Infect Immun* 1999;67:6206-6209
- 43 Liu X, Hu J, Zhang X, Fan D. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* urease B subunit. *Chin Med J* 2002;115:1513-1516
- 44 Kleanthous H, Myers G, Georgakopoulos K, Tibbitts T, Ingrassia JW, Gray HL, Ding RU, Zhang ZZ, Lei W, Nichols R, Lee CK, Ermak TH, Monath TP. Rectal and intranasal immunizations with recombinant urease induce distinct local and serum immune responses in mice and protect against *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immune* 1998;66:2879-2886
- 45 Michetti P, Kreiss C, Kotloff K, Porta N, Blanco J, Bachmann D, Herranz M, Saldinger PF, Corthesy-theulaz IE, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. Oral immunization with urease and escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* 1999;116:804-812
- 46 Saldinger PF, Porta N, Launois P, Louis JA, Waanders GA, Bouzourene H, Michetti P, Blum AL, Corthesy-Theulaz IE. Immunization of Balb/c mice with *Helicobacter urease B* induces a Thelper 2 response absent in *Helicobacter* infection. *Gastroenterology* 1998;115:891-897
- 47 Lee CK, Soike K, Hill J, Georgakopoulos K, Tibbitts T, Ingrassia J, Gray H, Boden J, Kleanthous H, Giannasca P, Ermak T, Weltzin R, Blanchard J, Monath TP. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease decreases colonization levels following experimental infection of rhesus monkeys. *Vaccine* 1999;17:1493-1505
- 48 Solnick JV, Canfield DR, Hansen LM, Torabian SZ. Immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease in specific-pathogen-free rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immun* 2000;68:2560-2565
- 49 侯鹏, 许国铭, 屠振兴. 幽门螺杆菌 VacA 基因分型与毒素活性关

- 系的研究进展. 国外医学·消化系疾病分册 1999;19:139-141
- 50 Ghiara P, Rossi M, Marchetti M, Di Tommaso AD, Vindigni C, Ciampolini F, Covacci A, Telford JL, De Magistris MT, Pizza M, Rappuoli R, Del Giudice G. Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infect Immun* 1997;65:4996-5002
  - 51 Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ti XH, Li ZS. *Helicobacter pylori* VacA genotypes and CagA status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol* 2000;6:605-607
  - 52 杨艺, 邓长生. 幽门螺杆菌黏附于胃黏膜的机制. 国外医学·消化系疾病分册 2000;20:79-82
  - 53 Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000;191:1467-1476
  - 54 Metzler B, Mayr M, Dietrich H, Singh M, Wiebe E, Xu Q, Wick G. Inhibition of arteriosclerosis by T-cell depletion in normocholesterolemic rabbits immunized with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1905-1911
  - 55 Todoroki I, Joh T, Watanabe K, Miyashita M, Seno K, Nomura T, Ohara H, Yokoyama Y, Tochikubo K, Itoh M. Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:159-163
  - 56 Jones AC, Logan RP, Foyne S, Cockayne A, Wren BW, Penn CW. A flagellar sheath protein of *Helicobacter pylori* is identical to HpaA, a putative N-acetylneuraminylactose-binding hemagglutinin, but is not an adhesin for AGS cells. *J Bacteriol* 1997;179:5643-5647
  - 57 Chen Y, Zhang ZS, Wang JD, Zhou DY. Cloning and expression of adhesion gene hpaA of *Helicobacter pylori*. *J First Mil Med Univ* 2000;20:210-213
  - 58 Chen Y, Wang J, Shi L. In vitro study of the biological activities and immunogenicity of recombinant adhesin of *Helicobacter pylori* rHpaA. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:276-279
  - 59 Kim BO, Shin SS, Yoo YH, Pyo S. Peroral immunization with *Helicobacter pylori* adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:291-298
  - 60 Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, DiLorenzo SC, Walker RI. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immun* 2001;69:3581-3590
  - 61 Goto T, Nishizono A, Fujioka T, Ikewaki J, Mifune K, Nasu M. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlate with protection against *Helicobacter pylori* infection after oral vaccination of mice. *Infect Immun* 1999;67:2531-2539
  - 62 Ikewaki J, Nishizono A, Goto T, Fujioka T, Mifune K. Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol Immunol* 2000;44:29-39
  - 63 Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, Monaci E, Douce G, Dougan G, Mills KH, Rappuoli R, Del Giudice G. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine* 2001;19:2534-2541
  - 64 Koesling J, Lucas B, Develioglou L, Aebischer T, Meyer TF. Vaccination of mice with live recombinant *Salmonella typhimurium* aroA against *H. pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. *Vaccine* 2001;20:413-420
  - 65 Bumann D, Metzger WG, Mansouri E, Palme O, Wendland M, Hurwitz R, Haas G, Aebischer T, von Specht BU, Meyer TF. Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine* 2001;20:845-852
  - 66 Liao W, Chen M, Zhu S. Construction of attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain expressing *Helicobacter pylori* catalase and observation on its protective immunity. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001;81:613-616
  - 67 Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine* 2001;19:3927-3935
  - 68 Kawahara M, Hashimoto A, Toida I, Honda M. Oral Recombinant mycobacterium bovis bacillus calmette-guerin expressing HIV-1 antigens as a freeze-dried vaccine induces long-term, HIV-specific mucosal and systemic immunity. *Clin Immunol* 2002;105:326-331
  - 69 Kawahara M, Matsuo K, Nakasone T, Hiroi T, Kiyono H, Matsumoto S, Yamada T, Yamamoto N, Honda M. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 2002;21:158-166
  - 70 Young SL, O'Donnell MA, Buchan GS. IL-2-secreting recombinant bacillus calmette guerin can overcome a Type 2 immune response and corticosteroid-induced immunosuppression to elicit a Type 1 immune response. *Int Immunol* 2002;14:793-800
  - 71 Young S, O'Donnell M, Lockhart E, Buddle B, Slobbe L, Luo Y, De Lisle G, Buchan G. Manipulation of immune responses to Mycobacterium bovis by vaccination with IL-2- and IL-18-secreting recombinant bacillus calmette guerin. *Immunol Cell Biol* 2002;80:209-215
  - 72 Zheng C, Xie P, Chen Y. Recombinant Mycobacterium bovis BCG producing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum FCC-1/HN strain induces strong immune responses in BALB/c mice. *Parasitol Int* 2002;51:1-7
  - 73 Mederle I, Bourguin I, Ensergueix D, Badell E, Moniz-Peireira J, Gicquel B, Winter N. Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in Mycobacterium bovis BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. *Infect Immun* 2002;70:303-314
  - 74 Zheng C, Xie P, Chen Y. Immune response induced by recombinant BCG expressing merozoite surface antigen 2 from Plasmodium falciparum. *Vaccine* 2001;20:914-919
  - 75 Chujoh Y, Matsuo K, Yoshizaki H, Nakasatomi T, Someya K, Okamoto Y, Naganawa S, Haga S, Yoshikura H, Yamazaki A, Yamazaki S, Honda M. Cross-clade neutralizing antibody production against human immunodeficiency virus type 1 clade E and B' strains by recombinant Mycobacterium bovis BCG-based candidate vaccine. *Vaccine* 2001;20:797-804
  - 76 Hiroi T, Goto H, Someya K, Yanagita M, Honda M, Yamanaka N, Kiyono H. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with rBCG-V3J1 induces a long term V3J1 peptide-specific neutralizing immunity in Th1- and Th2-deficient conditions. *J Immunol* 2001;167:5862-5867
  - 77 Ohara N, Matsuoka M, Nomaguchi H, Naito M, Yamada T. Protective responses against experimental Mycobacterium leprae infection in mice induced by recombinant Bacillus Calmette-Guerin over-producing three putative protective antigen candidates. *Vaccine* 2001;19:1906-1910
  - 78 Luo Y, Chen X, Szilvasi A, O'Donnell MA. Co-expression of interleukin-2 and green fluorescent protein reporter in mycobacteria: in vivo application for monitoring antimicrobial immunity. *Mol Immunol* 2000;37:527-536
  - 79 Miyaji EN, Mazzantini RP, Dias WO, Nascimento AL, Marcovistz R, Matos DS, Raw I, Winter N, Gicquel B, Rappuoli R, Leite LC. Induction of neutralizing antibodies against diphtheria toxin by priming with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing CRM(197), a mutant diphtheriatoxin. *Infect Immun* 2001;69:869-874
  - 80 Guy B, Hessler C, Fourage S, Haensler J, Vialon-Lafay E, Rokbi B, Millet MJ. Systemic immunization with urease protects mice against *Helicobacter pylori* infection. *Vaccine* 1998;16:850-856
  - 81 Blanchard TG, Czinn SJ, Nedrud JG. Host response and vaccine development to *Helicobacter pylori* infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;241:181-213

# 脂肪酸结合蛋白研究进展

冯爱娟, 陈东风

冯爱娟, 陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科 重庆市 400042  
项目负责人: 陈东风, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科.  
电话: 023-68757342  
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-02-12

## 摘要

脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding proteins FABPs)是一组低分子量(14-15 KD 左右)结合长链脂肪酸的胞质蛋白, FABPs 分布于哺乳动物的心肌、小肠、肝脏、脂肪组织、脑、表皮等组织细胞中. FABPs 以其在组织中的分布而命名, 包括心肌型(H-FABP)、小肠型(I-FABP)、肝脏型(L-FABP)、脂肪细胞型(A-FABP)、脑细胞型(B-FABP)、肾脏型(K-FABP)、骨骼肌型(S-FABP)、牛皮癣相关型(PA-FABP)及表皮型(E-FABP)等 9 种类型, 具有组织特异性, 在同一细胞中可分布多种 FABPs. 文献报道在长链脂肪酸的摄取、转运及代谢调节中发挥着重要作用. 本文对其组织分布、结构特性及脂肪酸的转运功能作一简要综述.

冯爱娟, 陈东风. 脂肪酸结合蛋白研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(8): 1457-1459

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1457.asp>

## 0 引言

脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding proteins FABPs)是一组低分子量(14-15 KD 左右)结合长链脂肪酸的胞质蛋白. 近年来, 已经采用大量实验方法对 FABP 的转运功能进行了研究. 这些方法包括分子水平的体内脂肪酸转运模型; 对脂肪酸的摄取和由基因控制的 FABP 的不同种类、数量的体内细胞转运的研究; 同时对缺乏特异 FABPs 表达的动物组织细胞进行检测. 研究数据均有力支持将 FABPs 定义为脂肪酸转运蛋白. 已经清楚知道 FABPs 周围包绕了大量的相关蛋白, 一些除结合脂肪酸外, 还结合了疏水的配体. 最近几年, 对 FABPs 的组织分布, 配体亲和力及特异性, 以及其结构特性进行了集中研究, 结果均表明 FABPs 参与细胞内脂质代谢.

## 1 FABPs 的分布、性质

FABPs 分布于哺乳动物的心肌、小肠、肝脏、脂肪组织、脑、表皮等组织细胞中, 已发现的 FABPs 包括心肌型(H-FABP)、小肠型(I-FABP)、肝脏型(L-FABP)、脂肪细胞型(A-FABP)、脑细胞型(B-FABP)、肾脏型(K-FABP)、骨骼肌型(S-FABP)、牛皮癣相关型(PA-

FABP)及表皮型(E-FABP)等 9 种类型<sup>[1]</sup>. FABPs 以其在组织中的分布而命名, 在同一细胞中可分布多种 FABPs, 例如在小肠内皮细胞上存在两种不同 FABPs, 即 L-FABP 和 I-FABP, 二者具有 29 % 的同源性. 在植物中也发现有 FABPs<sup>[2]</sup>. FABPs 大约有 130 个标准氨基酸, 在小鼠 L-FABP 结构中有 127 个残基, 包括起始 N- 甲酰蛋氨酸. 不同类型 FABPs 的氨基酸序列有 38-70 % 的同源性, 在空间结构上也有相似之处, 都存在两个  $\alpha$  螺旋和一个  $\beta$  折叠结构. 各型 FABPs 的两个短  $\alpha$  螺旋结构由肽链 N 末端的 7 个氨基酸组成,  $\beta$  折叠结构则是由 92 个氨基酸构成, 分为  $\beta$  A - J 八个片层. L-FABP 是第一个克隆并纯化的 FABP 家族的成员, 具有晶状体结构和氨基酸序列.

## 2 FABP 与脂肪酸代谢

2.1 FABPs 的结构特性 FABPs 结合脂肪酸分子甲基并限制脂肪酸分子移动的重要功能单位是一个由  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  CF 片层所组成的“开口”结构, 当此结构域与脂肪酸结合后, 由 7 个氢键所组成的静电网以及分子间范德华力的作用使得脂肪酸分子构象改变而被固定在 FABPs 分子内. FABPs “开口”结构在与脂肪酸结合的同时也与一个由 Ash11、Asp34 等组成的离子通道相耦联, 在特定的条件下通过这一离子通道的调节作用而结合或释放脂肪酸分子<sup>[3]</sup>. 这种结构决定了 FABP 能够结合各种类型脂肪酸, 在脂肪酸的摄取、转运及代谢调节中具有重要作用. 调节脂肪酸代谢是各型 FABP 的共同作用, 但在不同组织、不同条件下各型 FABP 的存在状况及活性均有所不同. 例如 H-FABP 特异地存在于心肌组织中, 约占心脏全部可溶性蛋白质的 4-8 %, H-FABP 与心肌细胞内的长链脂肪酸相结合, 将其从细胞质膜向脂化和氢化部位运输, 从而进入能量代谢体系氧化分解最终生成三磷酸腺苷(ATP), 为心肌收缩提供能量<sup>[4]</sup>.

2.2 FABPs 的配体结合特性 已对 FABPs 的转运功能进行了大量研究, 结果证明其转运功能与其和长链脂肪酸(C16-20)的亲和力密切相关. L-FABP 的结合特性是 FABP 家族中所特有的<sup>[5]</sup>, L-FABP 在细胞中, 特别是在细胞膜上, 不仅可与长链脂肪酸结合, 还可与其他酰基配体结合, 包括酰基辅酶 A, 磷脂, 血红素蛋白及胆汁酸盐. 其中与长链脂肪酸的结合亲和力最高. 研究表明高脂饮食可增加肝脏和小肠中 L-FABP、脂肪 A-FABP 含量, 对小肠 I-FABPs 无影响. 长链脂肪



酸的疏水特性使结合力的测定复杂化. Kurian et al<sup>[6]</sup>改进 1- 磷酸盐 -8- 苯胺羰基置换方法测定配体结合亲和力, 得出 L-FABP 对软脂酸盐、油酸盐、及花生四烯酸盐的亲和力最高. Richieri et al<sup>[7]</sup>利用不同的荧光方法检测 FABPs 与脂肪酸的亲和力, 结果证明 FABPs 的结合亲和力与脂肪酸的类型不同而不同(KD2-1 000 nm), 即饱和脂肪酸大于多聚不饱和脂肪酸. L-FABP 结合溶血磷脂酸、血红蛋白素、胆盐、两种类型的过氧化物酶体增生体激活受体(PPAR)、类花生四烯酸类物质和肝脏致癌原. 大部分视黄醛分布在肝脏, L-FABP 也结合视黄醇. L-FABP 的一部分配体有可能通过改变其结合特性, 来调控蛋白功能. 如参与糖分解的中产物糖与 6-磷酸葡萄糖结合, 增加对油酸盐及油酸辅酶 A 的亲和力. L-FABP 结合胆固醇的作用目前尚有争议. 小鼠 L-FABP 的晶体结构可以促进中性脂肪酸的结合. L-FABP 对油酸盐的亲和力随盐浓度的增加而降低.

2.3 FABPs 与脂肪酸代谢酶 大量的研究表明细胞内酶的活性是由 FABPs 调控的, 提出 FABPs 参与细胞内的脂质代谢. 已经对 FABPs 对线粒体和微粒体酶活性的作用, 特别是对 L-FABP 进行了研究, 对其他类型 FABPs 对细胞酶活性的研究未获取相关信息. 利用线粒体或微粒体制剂作为酶原提纯 FABPs 检测其对配体代谢的直接作用. 许多研究结果证明, FABPs 作为配体供体这一作用特性, 提示这些蛋白对配体特殊的靶作用以及 FABP 与酶类有直接交互作用, 如酰基辅酶 A 合成酶, 此酶催化长链脂肪酸酯化, 为脂肪酸代谢的第一步.

2.4 FABP 与体内脂肪酸的转运 脂肪酸是细胞生命重要的分子, 通过  $\beta$ -氧化分解产生 ATP, 酯化为甘油和固醇. 脂肪酸能否自由地从脂质双层转移或 FABPs 是否为转运所必需, 是脂代谢的关键问题. 试验表明未电离的脂肪酸或其衍生物能够快速通过磷脂双分子层. 多种因素影响脂肪酸从膜上被动转运<sup>[7]</sup>: (1)跨膜 pH 梯度; (2)脂肪酸在膜上结合区的分布; (3)游离脂肪酸转化为非透膜性衍生物(脂酰辅酶 A 酯); (4)为合成代谢和分解代谢利用脂肪酸. 目前长链脂肪酸有两种转运机制, 一是脂肪酸经过被动扩散穿过细胞膜; 另一种是在蛋白的参与下完成脂肪酸的跨膜转运(图 1).

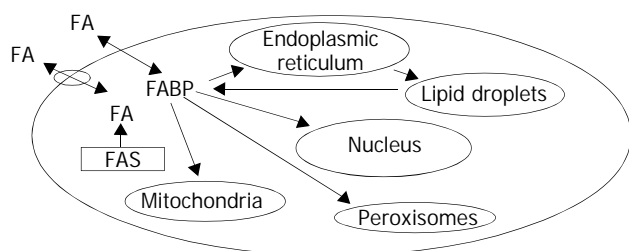


图 1 长链脂肪酸的细胞内转运. 脂肪酸跨膜转运是被动扩散或由蛋白介导的过程. FABP 可以介导脂肪酸胞质转运至多种细胞器, 包括线粒体(Mitochondria)、过氧化物酶体(Peroxisomes)、内质网(Endoplasmic reticulum)、细胞核(Nucleus)、脂滴(Lipid droplets).

细胞外的脂肪酸受体, 对脂肪酸及其衍生物的亲和力均促进脂肪酸的摄取. FABPs 最基础的功能是参与食物中脂质的利用. 脂肪酸摄取、代谢和储存多的组织, 如肝脏、脂肪细胞及肌肉, 其 FABP 的含量增加. Ockner et al<sup>[8]</sup>是最早发现高脂饮食可以增加肝脏和小肠中 L-FABP 的含量, 对 I-FABP 影响较小. 除可增加肝 L-FABP 的含量, 用高脂饮食喂养的啮齿类动物可以使过氧化物酶体增生、增加酯酰 CoA 氧化酶以及细胞色素 P450 4A1 和过氧化物酶氧化, 这些作用为过氧化物酶体增生体反应. 正常浓度的长链脂肪酸对组织中 FABPs 的含量无影响, 只有线粒体氧化功能受到抑制时, L-FABP 及过氧化物酶体氧化水平增加. 高脂饮食不但能增加 L-FABP 水平, 而且还能增加脂肪细胞 A-FABP 的含量, 对心脏、肾脏和肌肉的影响尚未发现<sup>[9]</sup>. 长链脂肪酸诱导 A-FABP 的表达, 并且 A-FABP 的表达水平与长链脂肪酸的量密切相关. 几种转录因子, 如过氧化物酶体增生体激活受体(PPAR)能够促进脂肪细胞分化, 且 PPAR DNA 结合区位于 A-FABP 基因启动子区域. 已经证明 PPAR 结合长链脂肪酸, 控制 A-FABP 基因表达, 提示增加长链脂肪酸的浓度可以诱导 A-FABP 的含量, 同样, L-FABP 也是通过 PPAR 来调控的. PPAR 在脂肪酸分解代谢率高的组织中高表达, 如肝脏、肾脏、心脏及肌肉组织中, 通过诱导线粒体和过氧化物酶体氧化水平及 L-FABP 基因表达来刺激脂肪酸分解代谢. 因为细胞内脂肪沉积可以增加 L-FABP 的含量, 因此可以推断 L-FABP 与线粒体和过氧化物酶体氧化有关<sup>[10]</sup>. 同时, L-FABP 又使胞质内游离脂肪酸含量保持最低浓度, 以免游离脂肪酸对胞膜的损害.

检测 FABPs 对脂肪酸内流的作用, 发现 L-FABP 可以增加油酸盐的内流, 对油酸盐表面扩散系数可以增加 6 倍<sup>[11]</sup>. 利用一系列荧光共振能量转换测定法对不同的 FABPs 家族成员不同的脂肪酸转运功能进行比较, 发现从 FABPs 到膜囊泡的脂肪酸转运比率可以发生变化, 认为 FABPs 的功能是作为脂质代谢过程分解代谢的或是合成代谢的中特异调控酶, 来维持细胞膜脂肪酸水平以及脂肪酸应答基因的表达规律<sup>[12]</sup>. 例如, FABP 可以作为一种完全或更特定的特异酶通过底物或产物在胞质间隙的浓度, 来调控脂质代谢, 参与脂肪酸的摄取与输出过程; 或者是通过从特殊酶上传送或消除脂肪酸来调控脂质代谢.

### 3 FABPs 测定方法

Ockner et al<sup>[8]</sup>于 1974 年在研究 I-FABP 时采用的放射免疫法获得纯化的 I-FABP, 然后用纯化 I-FABP 免疫家兔以获得 I-FABP 抗血清并用 <sup>14</sup>C 进行放射性标记, <sup>14</sup>C 标记抗血清与待测标本反应后, 通过测定免疫沉淀中放射性比活度来检测相应 I-FABP 的浓度. 1997 年 Wodzig et al<sup>[13]</sup>报道的一步法 ELISA 检测 FABPs, 操作尤为简捷, 整个测定过程仅需 45 min, 应用较广. 1998 年,

研究表明具有高亲和力的 FABPs, 作为细胞内和

Robers et al<sup>[14]</sup>采用免疫比浊法测定血浆中 FABPs, 这种方法的基本原理是将抗各型 FABPs 的单克隆抗体通过物理黏附法黏附到胶乳颗粒, 制成特定的胶乳检测试剂来检测相应 FABPs 的浓度, 操作更为简便快速.

总之, FABPs 具有组织特异性, 从分子水平采用大量方法来测定 FABPs 的脂肪酸转运功能, 其确切的转运机制尚不十分清楚, 有待进一步研究. 目前 FABPs 检测在心肌梗塞等疾病的早期诊断中具有重要的价值<sup>[15]</sup>. 近年来, FABPs 的测定还用于结肠癌、膀胱癌的早期诊断中, 由于结肠脱落上皮细胞、膀胱移行上皮细胞中 I-FABP、L-FABP 基因表达水平的检测有着重要价值, 一些分子生物学技术如核酸杂交、PCR、RT-PCR 等在这些方面已显现出一定的应用前景. 由于其参与脂肪酸的摄取转运及代谢, 因此, 对于 FABPs 的研究因脂肪酸代谢异常引起的疾病, 如 2 型糖尿病、肥胖症及脂肪肝等, 有重要的意义.

#### 4 参考文献

- 1 Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ, Glatz JF. Membrane associated and cytoplasmic fatty acid binding proteins. *Lipids* 1996;31(Suppl):223-227
- 2 Glatz JF, van der Vusse GJ. Cellular fatty acid-binding proteins: Current concepts and future directions. *Mol Cell Biochem* 1990; 98:237-251
- 3 Sacchettini JC, Gordon JJ. Rat intestinal fatty acid binding protein, A model system for analyzing the forces that can bind fatty acids to proteins. *J Biol Chem* 1993;268:18399-18402
- 4 董解菊. 脂肪酸结合蛋白测定及临床应用研究进展. 国外医学·临床生物化学与检验学分册 2001;22:74-76
- 5 Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Mol Cell Biol Lipid* 2000;1486: 28-44
- 6 Kurian E, Kirk WR, Prendergast FG. Affinity of fatty acid for ( $\gamma$ ) rat intestinal fatty acid binding protein: Further examination. *Biochemistry* 1996;35:3865-3874
- 7 Richieri GV, Low PJ, Ogata RT, Kleinfeld AM. Thermodynamics of fatty acid binding to engineered mutants of the adipocyte and intestinal fatty acid-binding proteins. *J Biol Chem* 1998;273:7397-7405
- 8 Ockner RK, Manning JA. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *Lipids* 1996;31:5223-5227
- 9 Kaikaus RM, Chan WK, Ortiz de Montellano PR, Bass NM. Mechanisms of regulation of liver fatty acid-binding protein. *Mol Cell Biochem* 1993;123:93-100
- 10 Zimmerman AW, van Moerkerk HT, Veerkamp JH. Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *J Biochem Cell Biol* 2001;33:865-876
- 11 Stewart JM, Driedzic WR, Berkelaar JA. Fatty-acid-binding protein facilitates the diffusion of oleate in a model cytosol system. *Biochem J* 1991;275:569-573
- 12 Wootan MG, Bernlohr DA, Storch J. Mechanism of fluorescent fatty acid transfer from adipocyte fatty acid binding protein to membranes. *Biochemistry* 1993;32:8622-8627
- 13 Wodzig KW, Pelsers MM, van der Vusse GJ, Roos W, Glatz JF. One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid binding protein. *Anal Biochem* 1997;34: 263-268
- 14 Robers M, Van der Hulst FF, Fischer MA, Roos W, Salud CE, Eisenwiener HG, Glatz JF. Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1998;44:1564-1569
- 15 Glatz JF, van der Vusse GJ, Simoons ML, Kragten JA, van Diejen-Visser MP, Hermens WT. Fatty acid-binding protein and the early detection of acute myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* 1998;272:87-92

# 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展

王永刚, 王宇明

王永刚, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市沙坪坝区 400038  
项目负责人: 王宇明, 400038, 重庆市沙坪坝区, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wym417@mail.tmmu.com.cn  
电话: 023-68754141 传真: 023-65334998  
收稿日期: 2003-01-04 接受日期: 2003-01-18

## 摘要

目前, 全球约有 3 亿 5 千万人感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV), 近 50 % 的感染者出现临床症状, 约有 5 % 发展为肝炎肝硬化, 而每年因 HBV 感染而死亡的人数近一百万. 对 HBV 相关的终末期肝病, 根治一直是世界性难题, 近年来, 原位肝移植(OLT)的成功开展无疑为此类患者带来了曙光. 如果不给予一定的预防措施, 其 OLT 后 HBV 再感染率可高达 58-83 %, 最高可达 90 %. 文献资料显示, OLT 后 HBV 再感染发生可能与术前 HBV 复制状态、抗 HBV 药物应用前后病毒变异、免疫抑制剂及糖皮质激素的应用、肝外组织 HBV 存在情况等因素有关. 本文就近年来相关的研究进展作一综述.

王永刚, 王宇明. 肝移植后乙型肝炎病毒再感染相关因素的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(9):1460-1464  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1460.asp>

## 0 引言

在乙型肝炎患者 OLT 研究热点中, 手术本身已不是难题, 而肝炎病毒的再感染问题越来越受到广泛关注<sup>[1]</sup>. 我国于 1977 年开展首例肝移植, 自 1993 年后, 尤其是最近几年, 肝移植得到了迅速发展<sup>[2,3]</sup>. 如果不给予一定的预防措施, 其 OLT 后 HBV 再感染率可高达 58-83 %, 最高可达 90 %<sup>[4]</sup>. 目前我国肝移植对象主要是乙型肝炎病毒感染的终末期肝病, 考虑到欧、美、日等国家 HBV 常为成人期感染, 而我国则以母婴传播为主, 前者较易清除病毒, 而后者更易发生免疫耐受, 故我国 OLT 后 HBV 再感染成为我国 OLT 事业的重大挑战. 尽管自 1978 年起乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)以及 1993 年后核苷类似物等抗病毒制剂的推广应用, 由于病毒变异及耐药性逃逸株形成等, HBV 再感染率仍未得到有效控制, 并成为影响乙型肝炎患者 OLT 后长期存活的重要原因之一<sup>[5-7]</sup>.

## 1 肝移植后 HBV 再感染

国外文献大多仅将肝移植后患者血清 HBsAg 或 HBV-DNA 阳性作为再感染诊断标准<sup>[8]</sup>. 按我国 2001 年中华病

毒性肝炎的防治方案, 肝移植术后 HBV 再感染的诊断, 至少需要具备以下 4 项中的 1 项: (1)血清 HBsAg 阳性; (2)血清 HBV-DNA 阳性; (3)血清 HBcAb-IgM 阳性; (4)肝内 HBsAg 和 / 或 HBcAg 阳性. 移植肝 HBV 再感染的病理学特征是融合的肝细胞气球样变, 进而出现溶解性坏死, 甚至小叶崩解, 门静脉周围纤维组织增生, 肝细胞内有淤胆现象, 但炎性细胞浸润并不明显, 几乎所有肝细胞免疫组化染色 HBsAg 及 HBcAg 均阳性. 临床症状可表现为迁延型及暴发型肝炎.

近年来, 随着抗病毒药物的推广应用, 包括乙型肝炎疫苗、HBIG、干扰素及核苷类似物如拉米夫定(LAM)等单独或联合应用, HBV 再感染已得到不同程度的控制, 但 HBV 再感染仍有发生, 而且发生 HBV 再感染后患者生活质量及生存率明显下降<sup>[9-16]</sup>. 但目前对 HBV 再感染率的报道并不一致, 可能与研究对象、围手术期的处理及术后治疗方案等不同有关.

Steinmuller et al<sup>[5]</sup>报道, 乙型肝炎肝移植后 5 a 生存率 HBV 再感染组 (69 %) 及 HCC 组 (60 %) 较其他组显著降低 ( $P < 0.01$ ); 而合并 HCV/HDV 感染的肝移植患者, 其生存率却稍好于单纯乙型肝炎感染患者, 但无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); 术前 HBV-DNA 阳性与 HBV-DNA 阴性患者术后 5 a 生存率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 但术前 HBeAg 阳性常预示生存率降低 ( $P < 0.05$  vs HBeAg 阴性组). 在无联合抗病毒措施情况下, 再感染所致的移植肝损害很明显; 而加服抗病毒药物后则有所改善, 2 a 生存率从第一时期 (1988-1993 年) 的 85 % 增加到第三时期 (1997-2000 年) 的 94 % ( $P < 0.05$ ), 两个时间段 2 a HBV 再感染率分别为 42 % 及 8 % ( $P < 0.05$ ). 而 Seehofer et al<sup>[17]</sup>在对 179 例乙型肝炎 OLT 患者进行分析后发现, 虽然所有患者均接受了 HBIG 预防性治疗, 术后 1、3 及 5 a 的 HBV 再感染率分别为 33 %、43 % 及 44 %; 52 % 的未接受抗病毒治疗的再感染患者在再感染后 1 a 内死亡; 肝移植后 HBV 再感染者移植肝 1 a 及 3 a 存活率分别仅有 42 % 及 25 %.

郑树森 et al<sup>[18,19]</sup>通过分析 40 例乙型肝炎相关肝病接受 OLT 后存活 2 mo 以上的患者, 术前 HBsAg 均阳性、HBV-DNA 阳性 12 例、HBeAg 阳性 10 例; OLT 术后即开始服用 LAM 100 mg/d. 但仍发现有 6 例 (15 %) 出现 HBV 再感染率; 其中 6 mo 再感染率为 12.2 %, 12 mo 再感染率为 23.5 %.

最近, Honaker et al<sup>[20]</sup>将患有乙型肝炎并接受肝移植的患者分为未接受 / 曾短期接受 HBIG 组、长期 HBIG

组、LAM/HBIG 联合组, 发现 3 组 HBV 再感染率分别是 100 %、21 % 及 0 ( $P < 0.001$ ), 而随访期间生存率分别为 50 %、71 %、100 % ( $P = 0.09$ ).

## 2 HBV 再感染的相关因素

**2.1 术前 HBV 的复制状态** 尽管在肝移植前采取了免疫预防措施, 但多数学者认为术前 HBV DNA 阳性患者术后 HBV 再感染率较高, 建议在术前尽量用药使其阴转<sup>[1, 18]</sup>. 另外, 手术前后抗病毒药物的应用亦将直接影响到 HBV 再感染率.

Seehofer et al<sup>[13]</sup> 对比了 HBV-DNA 阳性接受肝移植的患者术前抗病毒及术后的预防治疗后再感染情况. 共观察了 74 例 HBV-DNA 阳性并接受肝移植的患者. 术前选用 LAM 或泛昔洛韦治疗, 有 40 例术前未采取任何抗病毒治疗. 术前服用泛昔洛韦(1 500 mg/d)有 17 例, 服用 LAM(150 mg/d)17 例, 术后这 34 例患者均采用 HBIG 被动免疫, 抗体滴度维持在 100 U/L 以上, 并持续应用相应的抗病毒药物. 发现服用泛昔洛韦及 LAM 者 HBV-DNA 术前转阴率分别为 30 % 及 71 %; 术前未服用抗病毒药组 2 a 后 HBV 再感染率为 48 %, 相对于术前服用泛昔洛韦组 55 % 的再感染率并无统计学差异; 而术前 LAM 处理组仅有 18 % 的 HBV 再感染率. 因此认为, 移植前抗病毒药物的应用及移植后联合应用抗病毒药和被动免疫预防, 可使 HBV 再感染率明显下降. 亦有研究认为, 联合 LAM/HBIG 抗病毒治疗后, 术前 HBV-DNA 阳性与阴性者在术后 HBV 再感染率并无显著性差异<sup>[20]</sup>.

国内有学者认为, 术前 HBeAg 状态与术后 HBV 再感染关系不大, 可能因为国外肝移植中心研究中部分是 HCC, 而肝癌患者中整合到肝细胞中的 HBV-DNA 只有 HBsAg 是完整的, 因此很少产生 HBeAg; 另外, HBV-DNA 前 C 区突变, 亦可造成 HBeAg 分泌下降或分泌终止, HBeAg 阴性并不总意味着 HBV 复制的停止, 这些患者 HBV 可能仍存在高复制状态<sup>[18]</sup>.

**2.2 耐药性病毒变异株的产生** 多数研究认为, 移植前 YMDD 变异株存在及术后耐药性逃逸株的出现是导致 HBV 再感染的重要原因之一<sup>[21-25]</sup>. Rosenau et al<sup>[26]</sup> 在其观察的 21 例患者中, 平均术前 16.5 mo 即开始服用 LAM, 2 例出现 YMDD 变异株的患者分别在 OLT 后 13 d 及 75 d 发生了 HBV 再感染, 这可能与 HBV 变异株对 LAM 耐药有关.

Seehofer et al<sup>[8]</sup> 报道 34 例肝移植因乙型肝炎复发而接受 LAM 治疗患者, 尽管均持续应用了 HBIG, 但仍发展为 HBV 再感染. 不过发现在用 LAM 前, 21 例患者曾用过泛昔洛韦并产生耐药, 在随访的 12-49 mo 期间, 发现 19 例(56 %)产生了 LAM 耐药株. Fontana et al<sup>[27]</sup> 观察了 33 例术前 HBsAg 均阳性的乙型肝炎肝移植后患者, 在术后平均观察 61 wk 后, 有 13 例(40 %)LAM 治疗患者发现病毒水平反跳, 而且证实是由于出现 YMDD 变异株所致. 而 Malkan et al<sup>[28]</sup> 在早些时候就发现单独使

用 LAM 后, 有 19 % (6/32) 的患者因 HBV YMDD 变异而致病毒复制反跳.

新近 Papatheodoridis et al<sup>[29]</sup> 报道同样认为, LAM 的用于 OLT 后 HBV 再感染仅在一定程度上有效, 一般在术后 6 mo 左右即可出现 LAM 耐药株; 而且单一应用 LAM, HBV 再感染率随时间延长而上升.

HBV S 区变异株与其再感染亦可能有一定关系. Santantonio et al<sup>[30]</sup> 对 18 例 OLT 后进行 HBIG 预防性治疗患者观察后, 发现有 3 例(17 %)在治疗期间出现 HBV 再感染及相应的肝炎症状, 优势病毒群体序列分析显示, HBV S 区基因变异在核苷酸的 587 位点 G 变为 A, 相应的氨基酸是甘氨酸(Glycine)变为精氨酸(Arginine)即 G145A; 而 pre-S2 区移植前后则未发现一致性的序列变化. 因此认为, 长期应用多克隆的抗-HBs 免疫预防可对 G145A S 基因突变株有选择作用, 使其成为与移植肝再感染有关的优势病毒株. 而 Rodriguez-Frias et al<sup>[31]</sup> 则认为在急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎及肝炎肝硬化患者肝移植前就存在 HBV S 区基因变异株的积累, 由于预防性 HBIG 主要来源于感染 HBV 同源性较高的急性自限性患者, 因此并不能有效预防 HBV 再感染, 这可能亦是乙型肝炎肝移植后 HBV 再感染的原因之一.

**2.3 抗病毒药物的选择** 近年来, HBIG、泛昔洛韦、LAM 及联合用药后, HBV 再感染率有明显下降. 总的看来, 未进行预防性用药的乙型肝炎相关性肝病患者, 肝移植后 HBV 再感染率最高; 单独应用 HBIG 或 LAM 仍有 20-60 % 患者预防再感染失败, 而联合应用组 HBV 再感染率则明显较低<sup>[14, 20, 32]</sup>.

早期有报道单独使用泛昔洛韦的预防效果较差, 袁桂玉 et al<sup>[33]</sup> 总结 19 例 HBV 相关肝病患者, OLT 后泛昔洛韦治疗组 4 例全部发生再感染, LAM 组 13 例中 7 例再感染, HBV 抗原/HBV DNA 阳性者达 11 例. Berenguer et al<sup>[14]</sup> 共对 6 例肝移植后乙型肝炎感染患者(血清 HBsAg 及 HBV-DNA 阳性, 其中的 4 例 HBeAg 亦阳性)给予泛昔洛韦(500 mg, 3 次/d)治疗, 观察 12 mo, 未发现患者血清学抗-HBs 或抗-HBe 转为阳性, 仅 2 例患者病毒载量有所下降, 3 例患者 HBV-DNA 水平甚至高于治疗前, 因此认为单独使用泛昔洛韦在肝移植后抗 HBV 感染方面其作用有限. 不过, 亦有学者曾提出泛昔洛韦预防性治疗效果不错, 泛昔洛韦与 LAM 联合用药同样可使 HBV 再感染率明显下降<sup>[34]</sup>.

Petry et al<sup>[35]</sup> 报道了 1 例因暴发性乙型肝炎而接受紧急肝移植的 45 岁女性患者, 术前 HBV-DNA 阳性而 HBsAg 阴性, 术后第 1 天证实合并 HIV 感染, 治疗途中因 HIV 病毒血症明显而终止 LAM 应用, 后导致患者 HBV 的复制而致严重的肝失功. 新近有研究发现, 虽然长期 HBIG 与 LAM/HBIG 联合预防性治疗时 HBIG 维持的平均滴度均一样, 但 HBV 再感染率并不相同, 采取联合 LAM 预防性治疗后可使 HBV 再感染率显著降低<sup>[20]</sup>.

**2.4 免疫抑制剂** OLT 后患者均长期服用免疫抑制剂,

目前免疫抑制剂主要有四类: (1)皮质类固醇如强的松; (2)抗代谢药物如硫唑嘌呤及MMF; (3)神经钙蛋白抑制剂如环孢霉素及FK506等; (4)抗淋巴细胞制剂如胸腺细胞免疫球蛋白(ATG)及抗CD3单克隆抗体(OKT3)等。有研究认为, 免疫抑制剂的应用可增加病毒的复制, HBV基因组中存在糖皮质激素反应元件, 可与激素受体结合, 增强HBV基因的转录水平, 以致病毒复制增强, 加速移植肝HBV再感染进程<sup>[36, 37]</sup>。而且有学者认为, 皮质类固醇可刺激肝外组织释放HBV, 释放出的HBV在低水平被重新激活而再次表达<sup>[38, 39]</sup>。

Gonzalez et al<sup>[40]</sup>观察了乙型肝炎肝移植患者给予糖皮质激素及OKT3治疗急性排斥反应后的HBV-DNA及HBsAg水平变化, 发现所有观察病例肝移植后巨噬细胞、B细胞及CD<sub>4</sub><sup>+</sup>和CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞内均存在HBV-DNA, 而且在急性排斥反应发作者应用OKT3后HBV-DNA及HBsAg水平可迅速增加。然而, 在皮质类固醇组其水平却相对较低, 这一现象在未应用相应药物的患者未发现, 病毒水平增加则促成了移植肝HBV再感染。因此提出, 应用OKT3及皮质类固醇等免疫抑制剂可能促进乙型肝炎肝移植后HBV再感染, 在急性排斥反应时应用OKT3类药物要慎重。

**2.5 供体肝来源及质量** 由于严格的筛选检查, 供体肝带有HBV的可能性已经不大, 除非在需要紧急肝移植或供体来源严重不足的情况下。Shapira et al<sup>[10]</sup>首次报告了1例5岁男性患儿因甲型肝炎病毒所致FHF而接受其血清抗-HBc阳性的母亲部分亲体肝移植。移植后未采取免疫预防, 在移植18mo后发现HBV感染。

Joya-Vazquez et al<sup>[41]</sup>通过对血清抗-HBc阳性供体肝在肝炎肝硬化患者肝移植中的应用后, 研究认为抗-HBc阳性供体肝的应用并不影响移植植物与患者的存活, 但这些受体发生HBV再感染的机会要高出2.5倍, 而且再感染时间也相对较早, 不过LAM与HBIG联合应用可以使HBV再感染下降40%。

**2.6 组织配型差异** 最近Neumann et al<sup>[42]</sup>分析了84例肝炎肝硬化接受肝移植的患者, 随访1-110mo(平均55.6mo), 移植后即持续用HBIG行免疫预防。发现1a及5a生存率分别是90.5%、80.4%。因HBV再感染, 使得20例再感染者有15例(占75%)移植肝失功, 但发现在HLA-A与HLA-B相容性的移植肝HBV再感染率明显偏低( $P < 0.05$ )。另外, 相对于HLA-B完全不相容的乙型肝炎再感染患者, HLA-B 1或2相容性移植肝存活时间明显较长( $P = 0.02$ )。在终末期乙型肝炎行肝移植的患者, 似乎HLA-A、HLA-B相容性越高移植植物存活越好。但关于组织相容性与HBV再感染的关系早期亦有反面结论。

**2.7 肝外组织HBV的存在** 如前所述, 术前血清HBV DNA阳性似乎在OLT后HBV再感染率较高。但在实际工作中, 即使术前HBV DNA阴性, 亦不能完全避免HBV再感染<sup>[13, 18, 28]</sup>。早期研究发现外周血单个核细胞

(PBMC)内可检测到HBV DNA, 并认为与HBV感染的慢性化有关<sup>[43-45]</sup>。有研究发现, HBV感染可以通过接受HBV血清学阴性的供体获得<sup>[46]</sup>。新近Yue et al<sup>[47]</sup>研究认为, 胎儿期HBV侵入PBMC是其垂直传播免疫预防失败的重要原因之一。但目前PBMC中是否存在HBV复制仍有争议。

**2.8 再次肝移植** 多数学者认为, 再次OLT后移植肝HBV再感染率高于首次OLT<sup>[3]</sup>。Roche et al<sup>[48]</sup>报道了10例OLT后因HBV再感染致肝失功而接受了再次OLT, 虽然术后给予HBIG、阿糖腺苷及更昔洛韦等抗病毒治疗, 但最后大部分患者(6例)仍发生了二次移植肝HBV再感染以致肝失功而死亡。

另外, 国内有学者研究还认为, OLT术中与术后输血量可置换受体被HBV感染的血液, 降低循环血中HBV水平; 而且输入的新鲜血中各种杀伤细胞以及可能存在抗-HBs能够进一步清除残存的HBV, 加之肝移植除去了HBV赖以复制生存的大本营, 术后HBV再感染的可能性将减少<sup>[49, 50]</sup>。

总之, 乙型肝炎肝移植后HBV再感染依然是围绕各肝移植中心的一大难题。最近, Dahmen et al<sup>[51]</sup>用土拨鼠(woodchuck)首次建立起了肝移植乙型肝炎再感染模型; 土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV)阴性鼠为供体, 而病毒慢性携带鼠(3例)为肝移植受体。最后认为, 土拨鼠是研究肝移植HBV再感染较为合适的动物模型, 而且能很好的耐受手术; 病毒在移植植物出现的首要标志是WHsAg, 可在肝窦内检出, 而再感染的证实有赖于大多数肝细胞内WHsAg和WHcAg染色阳性及移植肝内检出病毒DNA与RNA。由此, 随着对HBV再感染因素及其机制的深入研究, 供体肝来源与质量的不断优化, 以及新的抗病毒药物研制及其应用的不断发展<sup>[52, 53]</sup>, 肝移植后HBV再感染将有望进一步得到控制, OLT的应用将会得到进一步拓宽。

### 3 参考文献

- 1 Bramhall SR, Minford E, Gunson B, Buckels JA. Liver transplantation in the UK. *World J Gastroenterol* 2001;7:602-611
- 2 郑树森, 梁廷波, 徐晓, 王伟林, 沈岩, 张珉, 黄东胜. 肝脏移植10 a 120例经验回顾. *中华普外科杂志* 2003;18:71-73
- 3 庄辉. 减少肝炎复发, 提高肝移植存活率. *中华肝脏病杂志* 2002;10:5-6
- 4 Karliova M, Malago M, Trippler M, Valentin-Gamazo C, Rothaar T, Broelsch CE, Gerken G, Treichel U. Seroconversion in patients with acute hepatitis B reinfection after liver transplantation with a combined treatment of lamivudine and hepatitis B immune globulin. *Transplant Proc* 2002;34:3319-3322
- 5 Steinhilber T, Seehofer D, Rayes N, Muller AR, Settmacher U, Jonas S, Neuhaus R, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Increasing applicability of liver transplantation for patients with hepatitis B-related liver disease. *Hepatology* 2002;35:1528-1535
- 6 Ben-Ari Z, Daudif N, Kleinf A, Sulkes J, Papo O, Mor E, Samra Z, Gadba R, Shouval D, Tur-Kaspa R. Genotypic and phenotypic resistance: longitudinal and sequential analysis of hepatitis B virus polymerase mutations in patients with lamivudine resistance after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2003;98:151-159
- 7 徐晓刚, 陆志檬. 肝移植与肝炎病毒再感染. *中华肝脏病杂志* 2002;10:75-76



- 8 Seehofer D, Rayes N, Steinmuller T, Muller AR, Settmacher U, Neuhaus R, Radke C, Berg T, Hopf U, Neuhaus P. Occurrence and clinical outcome of lamivudine-resistant hepatitis B infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001;7: 976-982
- 9 Anselmo DM, Ghobrial RM, Jung LC, Weaver M, Cao C, Saab S, Kunder G, Chen PW, Farmer DG, Yersiz H, Baquerizo A, Geevarghese S, Han SH, Goldstein L, Holt CD, Gornbein JA, Busuttil RW. New era of liver transplantation for hepatitis B: a 17-year single-center experience. *Ann Surg* 2002;235:611-619
- 10 Shapira R, Daudi N, Klein A, Shouval D, Mor E, Tur-Kaspa R, Dinari G, Ben Ari Z. Seroconversion after the addition of famciclovir therapy in a child with hepatitis B virus infection after liver transplantation who developed lamivudine resistance. *Transplantation* 2002;73:820-822
- 11 Angelico M, Di Paolo D, Trinito MO, Petrolati A, Araco A, Zazza S, Lionetti R, Casciani CU, Tisone G. Failure of a reinforced triple course of hepatitis B vaccination in patients transplanted for HBV-related cirrhosis. *Hepatology* 2002;35:176-181
- 12 Mutimer D, Feraz-Neto BH, Harrison R, O'Donnell K, Shaw J, Cane P, Pillay D. Acute liver graft failure due to emergence of lamivudine resistant hepatitis B virus: rapid resolution during treatment with adefovir. *Gut* 2001;49:860-863
- 13 Seehofer D, Rayes N, Naumann U, Neuhaus R, Muller AR, Tullius SG, Berg T, Steinmuller T, Bechstein WO, Neuhaus P. Preoperative antiviral treatment and postoperative prophylaxis in HBV-DNA positive patients undergoing liver transplantation. *Transplantation* 2001;72:1381-1385
- 14 Berenguer M, Prieto M, Rayon M, Bustamante M, Carrasco D, Moya A, Pastor MA, Gobernado M, Mir J, Berenguer J. Famciclovir treatment in transplant recipients with HBV-related liver disease: disappointing results. *Am J Gastroenterol* 2001;96:526-533
- 15 Seehofer D, Rayes N, Neuhaus R, Berg T, Muller AR, Bechstein WO, Neuhaus P. Antiviral combination therapy for lamivudine-resistant hepatitis B reinfection after liver transplantation. *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1): S359-S362
- 16 Seehofer D, Rayes N, Berg T, Neuhaus R, Hopf U, Muller AR, Bechstein WO, Neuhaus P. Additional interferon alpha for lamivudine resistant hepatitis B infection after liver transplantation: a preliminary report. *Transplantation* 2000; 69:1739-1742
- 17 Seehofer D, Rayes N, Bechstein WO, Naumann U, Neuhaus R, Berg T, Hopf U, Langrehr JM, Steinmuller T, Platz KP, Muller AR, Neuhaus P. Therapy of recurrent hepatitis B infection after liver transplantation. A retrospective analysis of 200 liver transplantations based on hepatitis B associated liver diseases. *Z Gastroenterol* 2000;38:773-783
- 18 Zheng SS, Wu J, Wang W, Huang D, Liang T, Lu A. Lamivudine as prophylaxis against hepatitis B virus reinfection following orthotopic liver transplantation. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002; 82:445-448
- 19 Zheng SS, Huang D, Wang W, Liang T, Zhang M, Shen Y, Wu J, Xu X, Lu AW, Liao SY. Orthotopic liver transplantation for end-stage liver diseases in 71 cases. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:7-9
- 20 Honaker MR, Shokouh-Amiri MH, Vera SR, Alloway RR, Grewal HP, Hardinger KL, Kizilisik AT, Bagous T, Trofe J, Stratta RJ, Egidi MF, Gaber AO. Evolving experience of hepatitis B virus prophylaxis in liver transplantation. *Transpl Infect Dis* 2002;4:137-143
- 21 Terrault N. Management of hepatitis B virus infection in liver transplant recipients: prospects and challenges. *Clin Transplant* 2000;14(Suppl 2):39-43
- 22 Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci* 2001;8:237-247
- 23 Ben-Ari Z, Mor E, Shapira Z, Tur-Kaspa R. Long-term experience with lamivudine therapy for hepatitis B virus infection after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001;7:113-117
- 24 Gutfreund KS, Williams M, George R, Bain VG, Ma MM, Yoshida EM, Villeneuve JP, Fischer KP, Tyrrel DL. Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance. *J Hepatol* 2000; 33: 469-475
- 25 Seta T, Yokosuka O, Imazeki F, Tagawa M, Saisho H. Emergence of YMDD motif mutants of hepatitis B virus during lamivudine treatment of immunocompetent type B hepatitis patients. *J Med Virol* 2000;60:8-16
- 26 Rosenau J, Bahr MJ, Tillmann HL, Trautwein C, Klempnauer J, Manns MP, Boker KHW. Lamivudine and low-dose hepatitis B immune globulin for prophylaxis of hepatitis B reinfection after liver transplantation possible role of mutations in the YMDD motif prior to transplantation as a risk factor for reinfection. *J Hepatol* 2001;34:895-902
- 27 Fontana RJ, Hann HW, Wright T, Everson G, Baker A, Schiff ER, Riely C, Anschuetz G, Riker-Hopkins M, Brown N. A multicenter study of lamivudine treatment in 33 patients with hepatitis B after liver transplantation. *Liver Transpl* 2001;7: 504-510
- 28 Malkan G, Cattral MS, Humar A, Al Asghar H, Greig PD, Hemming AW, Levy GA, Lilly LB. Lamivudine for hepatitis B in liver transplantation: a single-center experience. *Transplantation* 2000; 69:1403-1407
- 29 Papatheodoridis GV, Sevastianov V, Burroughs AK. Prevention of and treatment for hepatitis B virus infection after liver transplantation in the nucleoside analogues era. *Am J Transplant* 2003; 3:250-258
- 30 Santantonio T, Gunther S, Sterneck M, Rendina M, Messner M, Launois B, Francavilla A, Pastore G, Will H. Liver graft infection by HBV S-gene mutants in transplant patients receiving long-term HBIg prophylaxis. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:1848-1854
- 31 Rodriguez-Frias F, Buti M, Jardi R, Vargas V, Quer J, Cotrina M, Martell M, Esteban R, Guardia J. Genetic alterations in the S gene of hepatitis B virus in patients with acute hepatitis B, chronic hepatitis B and hepatitis B liver cirrhosis before and after liver transplantation. *Liver* 1999;19:177-182
- 32 Rosenau J, Tillmann HL, Bahr MJ, Trautwein C, Boeker KH, Nashan B, Klempnauer J, Manns MP. Successful hepatitis B reinfection prophylaxis with lamivudine and hepatitis B immune globulin in patients with positive HBV-DNA at time of liver transplantation. *Transplant Proc* 2001;33:3637-3638
- 33 Yuan GY, Duan Y, Wang F, Liang S Sr, Zhu L. Prevention and treatment of HBV reinfection following liver transplantation. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:14-16
- 34 Rayes N, Neuhaus R, Naumann U, Hopf U, Haller GW, Bechstein WO, Neuhaus P. Treatment of hepatitis B-reinfection or de novo-infection after liver transplantation with famciclovir-how effective is it? *Transplant Proc* 1999; 31:481-482
- 35 Petry W, Adams O, Haussinger D. Fatal hepatitis B reinfection after orthotopic liver transplantation in an HBsAg negative patient following withdrawal of lamivudine. *J Hepatol* 2000;33:514-515
- 36 Shiota G, Harada K, Oyama K, Udagawa A, Nomi T, Tanaka K, Tsutsumi A, Noguchi N, Kishimoto Y, Horie Y, Suou T, Kawasaki H. Severe exacerbation of hepatitis after short-term corticosteroid therapy in a patients with "latent" chronic hepatitis B. *Liver* 2000;20:415-420
- 37 Liaw YF. Hepatitis viruses under immunosuppressive agents. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:14-20
- 38 Markovic S, Drozina G, Vovk M, Fidler-Jenko M. Reactivation of hepatitis B but not hepatitis C in patients with malignant lymphoma and immunosuppressive therapy. A prospective study in 305 patients. *Hepatogastroenterology* 1999;46:2925-2930
- 39 Tsou PL, Lee HS, Jeng YM, Huang TS. Submassive liver necrosis in a hepatitis B carrier with Cushing's syndrome. *J Formos Med Assoc* 2002;101:156-158
- 40 Gonzalez RA, de la MM, de la Torre J, Mino G, Pera C, Pena J, Munoz E. Levels of HBV-DNA and HBsAg after acute liver

- allograft rejection treatment by corticoids and OKT3. *Clin Transplant* 2000;14:208-211
- 41 Joya-Vazquez PP, Dodson FS, Dvorchik I, Gray E, Chesky A, Demetris AJ, Shakil O, Fung JJ, Vargas HE. Impact of anti-hepatitis Bc-positive grafts on the outcome of liver transplantation for HBV-related cirrhosis. *Transplantation* 2002;73:1598-1602
- 42 Neumann UP, Langrehr JM, Naumann U, Lang M, Rayes N, Steinmuller T, Radtke C, Neuhaus P. Impact of HLA-compatibilities in patients undergoing liver transplantation for HBV-cirrhosis. *Clin Transplant* 2002;16:122-129
- 43 Cabrerizo M, Bartolom inverted question marke J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000;32:116-123
- 44 Tai DI, Chung ZJ, Chen CL, Eng HL. Reappearance of HBsAg with compartmentalized different HBV strains in allograft versus PBMC of the recipient. *J Gastroenterol* 2001;36:200-205
- 45 Trippler M, Meyer zum Buschenfelde KH, Gerken G. HBV viral load within subpopulations of peripheral blood mononuclear cells in HBV infection using limiting dilution PCR. *J Virol Methods* 1999;78:129-147
- 46 Cabrerizo M, Bartolome J, Carreno V. In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by a defective hepatitis B virus with a deletion in the PreS1 region of the viral genome. *J Viral Hepat* 2002;9:265-271
- 47 Yue Y, Meng J, Zhang S. Mechanism of peripheral blood mononuclear cell invasion by HBV on artificial immunization in newborns. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:1380-1382
- 48 Roche B, Samuel D, Feray C, Majno P, Gigou M, Reynes M, Bismuth H. Retransplantation of the liver for recurrent hepatitis B virus infection: the Paul Brousse experience. *Liver Transpl Surg* 1999;5:166-174
- 49 陈大志, 韩明子, 杨致富, 单世光. 肝移植后乙型肝炎的复发和防治. *中华器官移植杂志* 2000;21:278-280
- 50 卢实春, 李波, 严律南, 文天夫, 赵纪春, 王晓波, 刘冲, 马玉奎, 张秀辉. HBV 活跃复制肝移植受体在拉米夫定预防下 HBV 标志物动态变化的研究. *肝脏* 2002;7:76-78
- 51 Dahmen U, Li J, Dirsch O, Fiedler M, Lu M, Roggendorf M, Broelsch CE. A new model of hepatitis B virus reinfection: liver transplantation in the woodchuck1. *Transplantation* 2002;74:373-380
- 52 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
- 53 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消 息 •

## 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*)申报的2002年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会务会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801).资助期限2年,2003 - 2004年,资助强度每年8万元.

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报(英),计算数学(英),理论物理通讯(英)中国物理快报(英),力学学报(英),分析化学,高等学校化学学报,化学学报,化学通报,中国化学工程学报(英),世界胃肠病学杂志(英),作物学报,中国农业科学,中国中西医结合杂志,中国药理学报(英),生物化学与生物物理学报,细胞研究(英),植物学报(英),大气科学进展(英),地球物理学报,地质学报(英),金属学报,稀土学报(英),材料科学技术(英),稀有金属材料与工程,电力系统自动化,计算机科学技术学报(英),管理科学学报,中国科学(中、英),科学通报(中、英).

(世界胃肠病学杂志社2002-10-18)

# 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法

李 梢, 张学工, 季 梁, 李衍达

李梢, 张学工, 季梁, 李衍达, 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室 北京市 100084

李梢, 男, 1973-10-22 生, 安徽徽州人, 汉族. 1995 年北京中医药大学本科毕业, 2001 年北京中医药大学博士, 2001-2003 年清华大学生物信息学研究所博士后, 讲师. 主要从事自身免疫和炎症疾病、中医药生物信息学研究. 国家自然科学基金重点资助项目、青年基金项目, No.90209002, 30200365; 中国博士后科学基金资助项目, No. 2002-11

项目负责人: 李梢, 100084, 北京市海淀区清华园 1 号, 清华大学生物信息学研究所、生物信息学教育部重点实验室. shaoli@mail.tsinghua.edu.cn  
电话: 010-62794294

收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-24

## 摘要

本文简述近年来复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法, 并介绍清华大学生物信息学教育部重点实验室的有关工作. 由于遗传、环境的相互作用及基因型-表型复杂的内部结构, 常用的家系研究、基于遗传图谱的连锁分析、基于物理图谱的定位克隆以及关联分析等单基因病策略与方法, 在复杂性疾病的分子机制研究上存在局限. 在后基因组时代, 生物信息学的发展, 为从分子水平和系统观念研究复杂性疾病, 以及研究模式从“序列→结构→功能”向“相互作用→网络→功能”的转变提供了契机. 从多因素分析、基因的相互作用着手研究复杂性疾病成为热点. 我们以信息、系统的观点, 从功能基因组系统学出发研究复杂性疾病的机制, 并在复杂性疾病的基因组合及相互作用信息提取、复杂性疾病基因转录水平和表达水平的芯片分析、多层次生物信息整合、分子调控网络建模、中医药生物信息学等方面进行了有益的尝试.

李梢, 张学工, 季梁, 李衍达. 复杂性疾病生物信息学研究的策略与方法. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1465-1469

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1465.asp>

## 0 引言

随着人类基因组计划的发展, 目前生命科学进入了快速、准确、低耗分析遗传和表达的信息时代. 生物信息学(Bioinformatics)作为当今生命科学研究最重要的平台技术, 其目标是揭示基因组信息结构的复杂性及遗传语言的根本规律<sup>[1]</sup>, 并阐明人类约 10 万种蛋白质的结构、功能、相互作用以及与各种人类疾病之间的关系, 寻求各种治疗和预防措施. 自 1980 年代末期以来, 生物信息学相继推动了系统生物学(systems biology)<sup>[2]</sup>、功能基因组系统学<sup>[1, 3]</sup>等的兴起, 发展了从系统观、信息结构、“复杂性”研究健康与疾病的新方法, 并已深入到与人类疾病密切相关的基因组学、蛋白质组学、药物基因组学<sup>[4]</sup>等各个领域.

## 1 遗传-环境的相互作用及基因型-表型复杂的内部结构

疾病的发生与环境(环境有害因素)和遗传(遗传易感性)有关. 单基因病(monogenic disease)是疾病发病的遗传因素中以单基因缺陷占主导地位, 且在家系成员中疾病传递符合孟德尔规律者. 复杂性疾病(complex diseases)则是由多个基因及环境因素(包括致病微生物)相互作用所致, 且在家系中不符合孟德尔规律, 又称为多基因病(polygenic diseases), 多基因遗传病(polygenic inheritance diseases), 多因子病(multifactorial diseases). 如肿瘤、心血管病、代谢性疾病、神经-精神类疾病<sup>[5]</sup>、免疫性疾病<sup>[6]</sup>、帕金森氏症<sup>[7]</sup>、肠癌<sup>[8]</sup>等. 由于机体常见的疾病、健康状态是环境暴露、遗传易感性和年龄等因素复杂交互作用的结果, 基因-环境各种因素之间往往存在复杂的非线性关系, 因此导致研究上存在困难.

1.1 微效基因的困扰, 以及由此导致的预选基因难以选择 复杂性疾病的特点往往是由多个中效、微效基因共同决定疾病的复杂性状, 仅一个基因的改变对疾病的发生、发展, 以及对药物作用的影响不大, 其中某一或某些基因位点仅对应于该疾病的某个亚型、某个症状或体征<sup>[9]</sup>.

1.2 遗传与环境因素的交互作用分离 复杂性疾病的发病率, 即疾病外显性(penetrance)取决于后天环境因素影响的性质及程度. 目前按临床表现进行分类诊断的一个疾病, 实际上可能是由一组致病基因、或易感基因、或环境因素不同, 而表型相似的疾病组成, 如糖尿病. 群体中也存在具有遗传易感性但不发病或尚未发病的亚群. 缺乏对疾病形成过程中环境作用的有效控制途径, 必然导致研究对象的内部异质性, 从而影响疾病相关基因的研究. 随着多因素相关性疾病中遗传因素的作用以及遗传因素和环境因素互动认识的进一步深入, 将有可能改变现有的疾病分类方法.

1.3 疾病基因型与表型(gene-to-phenotype)存在复杂的关系, 以及丰富的内部结构<sup>[10]</sup> 疾病基因型与表型存在多因素致病、多基因调控、涉及多个层次、临床表型复杂等特征. 如类风湿性关节炎(RA)的病理、免疫学改变虽然相似, 但其临床表现、基因表达谱改变却呈现出多样性<sup>[11]</sup>. 同时, 复杂病的遗传易感性不一定是对疾病表型本身的直接影响, 而可仅是对疾病中间性状影响的间接后果. 可以认为, 现代医学与分子遗传学在疾病解释上存在可能的矛盾, 即对于复杂疾病而言, 分子遗传学的解释过于概括, 以致不适用于分为若干不同类别、乃至亚组的特定疾病.

## 2 几种利用遗传标记分析遗传病方法的局限

单基因遗传病由于因素单一, 基因型-表型关系清晰, 已经形成了较为成熟的患病家系研究、病例/对照分析法、患病同胞对法、传递不平衡测试法(transmission/disequilibrium test, TDT), 以及基于遗传图谱的连锁分析(linkage analysis)、基于群体病例-对照(case-control populations)的关联分析(association study)、基于物理图谱的定位克隆等策略与方法<sup>[12, 13]</sup>. 其中遗传家系的连锁分析包括参数方法和非参数方法. TDT法实质上是一种以家系为基础的病例/对照关联分析法. NCBi的OMIM数据库已经收集了众多单基因遗传病的致病基因.

定位克隆已被证实是克隆基因尤其是人类群体中遗传疾病相关基因的一种有效手段<sup>[14]</sup>. 复杂疾病的致病基因则很难用位置克隆法及致病基因定位、分离技术体系来确定<sup>[15]</sup>, 从可能的疾病易感位点到致病基因的跨越也充满困难. 相对于定位主效基因十分有效的连锁分析法来说, 关联分析法定位弱效基因的能力要强得多<sup>[16]</sup>. 关联分析法侧重于研究遗传标记与疾病的关联关系, 然而受到需首先大致确定致病基因位置的局限. Baier et al<sup>[17]</sup>曾试图利用位置克隆法定位II型糖尿病的易感基因. 运用关联分析表明, 一个位于内含子区域的多态位点UCSNP-43与疾病易感性密切相关, 这一位点位于CAPN10基因内. 对一段包含CAPN10基因的长为66 kb的区域进行测序发现了179个多态位点. 对其中的63个位点进行的病例/对照研究表明, 杂合体比纯合体更容易患病. 这意味着可能是CAPN10与其周围的某个遗传因素复杂的相互作用导致了糖尿病易感性的差异<sup>[18]</sup>. 即是环境与人类基因、基因产物相互作用的结果, 以致最终的致病因素仍难确证.

## 3 新的研究策略: 生物信息学和系统观

从“序列→结构→功能”的生物学观点是既往复杂性疾病机制研究的基础, 即认为基因组本身包含蛋白质结构的所有必需信息, 这一观点过于简单并有太多还原论色彩. 由于生理-化学原理和生物学机制都不可避免地要涉及分子相互作用和反应的时空依赖性, 当前从“相互作用→网络→功能”的模式出发, 在转录组和蛋白质组层次研究基因调控网络、蛋白质相互作用网络的丰富信息成为后基因组学、生物信息学的前沿和热点<sup>[19]</sup>. 同时, 功能基因组研究也开始朝复杂系统的方向发展<sup>[1]</sup>. 这为复杂性疾病在大量已有数据资料的分析处理基础上, 由局部朝向整体, 由孤立朝向系统提供了可能.

3.1 以系统的观点适于阐发复杂疾病中遗传与环境的复杂关系 生物是在遗传信息与外界信息作用下的一个复杂、有序的动态系统. 基因组的调控与信息系统的调控具有相似的规律<sup>[3]</sup>. 借鉴生命作为复杂系统的自组织现象, 以及基因的表达调控过程, 我们建立了基于基因表达调控的进化模型. 分析了其由简单结构向复杂结构进

化的趋势. 并发现高级复杂结构的出现是在一定的外界环境下, 生物种群内部出现的自组织过程<sup>[20, 21]</sup>.

3.2 以系统的观点适于阐发复杂疾病中基因功能的特点 计算与实验相结合的系统生物学方法有助于深入认识复杂的生物系统功能<sup>[22]</sup>. 而在系统水平上理解生物体, 需要侧重于细胞、机体的功能而不是孤立的局部特点<sup>[1]</sup>. 亦即研究各级产物的相互作用、整体形式比逐个研究基因产物将更为可取.

3.3 以系统的观点适于分析疾病基因型-表型之间的复杂关系 复杂疾病同一表型可能是由于同一代谢途径或信号传导途径上不同基因发生突变的结果, 在一个群体中孤立地研究某一个或几个热门基因将难以得出满意的结论<sup>[23]</sup>. 因此, 在复杂疾病基因组分析中应注重对基因功能以及相关生化通路的阐明. 目前基因组研究已重视对生命基本过程的分析, 以及对基因调控、信号传导等的研究, 如生化途径数据库KEGG的建立<sup>[24]</sup>等.

因此, 以系统观为特点的生物信息学研究策略与方法, 有望突破单基因病分析方法在复杂疾病研究中的局限. 并将在生物学和临床医学的诊断、治疗、药物开发等方面提供理论指导和分析, 具有广泛而关键的应用价值<sup>[25-27]</sup>.

## 4 复杂疾病的基因组合及相互作用信息提取

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是疾病易感性、外显性、抵抗性以及药物反应性等生物学性状差别的重要遗传学基础. 很多疾病与基因突变或基因多态有关. 分析基因型数据, 特别是将SNPs数据与疾病和致病因素相关的计算方法是生物信息学研究的重点之一. 不同于传统的单基因研究方式, 目前对基因的相互作用、多个基因组合与疾病关系的研究日益受到关注.

在基因组层次上发展的多因子与表型关联算法, 可提供与表型相关的多个基因相互作用的信息. 复杂疾病的基因研究在设计上可表述为, 通过对病例和对照的实际样本(A, C, T, G)、一定数量SNPs的检测(可看作向量X), 从而寻找疾病有无或轻重的变量和向量X之间的关系. 现有的基于连锁分析、关联分析的研究多是针对X的单个分量展开, 忽略了各分量之间的关系. 提取有效基因组合的算法则是从各分量之间的关系入手, 研究多个可能致病因素的综合效果, 从而给疾病的预测、诊断以及个性化治疗提供依据. 我们应用小样本情况下的主效多因提取方法, 从基因的联合作用出发研究偏执型精神分裂症, 结果表明不同的SNPs组合可能反映出疾病的不同亚型<sup>[28]</sup>. 同时, 在致病因素与临床表型的系上, 通过对胃癌前病变与Helicobacter pylori关系的Cluster分析表明, 不同临床表现的组合对于Helicobacter pylori感染具有不同的诊断准确率<sup>[29]</sup>. 这为运用生物信息学对分子信息、病理及临床试验的资料进行整合, 通过一些重要的疾病致病因素, 从相互

关系阐释复杂疾病的病因及其诊断提供了初步的依据。

由于复杂疾病的机制涉及多个基因的累加作用, 以及某些环境因子的作用, 这些基因的SNPs及其特定组合可能是造成疾病易感性最重要的原因。最近Zhao et al<sup>[30]</sup>提出了病例-对照研究中分析SNPs单倍型与环境因素的方法, 并通过分析载脂蛋白CIII(6SNPs)与冠心病术后再狭窄, 发现2种单倍型可能降低术后再狭窄患病风险。随着SNPs的不断发现和人类第三代遗传标记图的绘制等进展, 与疾病相关的人类基因信息数据库、与基因组多态性和基因突变有关的数据库dbSNP<sup>[31]</sup>、HGBASE<sup>[32]</sup>等相继建立, 为从SNPs探讨复杂性疾病的机制探讨提供了可行性。因此, 对疾病相关调节通路的候选基因进行SNPs的关联研究, 可能是多基因疾病研究取得突破的希望所在。目前我们同时还提出了一种新的基于SNPs数据, 用于研究复杂疾病和对疾病进行亚型分类的方法, 这一研究方法可以在小样本条件下充分利用已有的信息资源, 计算复杂度降低<sup>[28]</sup>。

同时, 寻找与表型相关的有意义的多基因组合还需要加强以下方面的研究: (1)预选基因的采集需要集中于主要的代谢途径、调控通路, 从而避免由于样本分散导致的样本量相对减少; (2)实验设计中预选的疾病相关基因可能存在遗漏, 如果致病基因的作用具有累加性, 仍有可能准确地找到致病相关基因。候选基因组合中的最佳基因数目取决于样本数和基因缺失比率<sup>[28]</sup>。因此研究中预先指定基因组合中的基因数目并不合理, 特别是孤立地研究单个基因与复杂疾病的关系往往不是最优选择, 并经常会导致信息利用的不充分。 (3)试验中病例本身的缺失也是潜在的偏差来源。目前对于缺失数据(missing data)的分析有均值、协方差的ML模型<sup>[33]</sup>, 自回归模型<sup>[34]</sup>, EM算法<sup>[35]</sup>, 归因(imputation)等方法, 然而仍需要通过进一步的研究, 形成较一致的认识。

## 5 芯片生物信息分析与多层次信息融合

解析复杂疾病基因型-表型的关系, 需要综合多层次信息, 如人类全部基因在染色体上的位置、序列特征(包括SNPs)、表达规律和产物(RNA和蛋白质)等。基因芯片, 如生物芯片(biochip)、微阵列(Microarray)、DNA芯片(DNA chip), 以及蛋白芯片等高通量检测技术, 使得高密度的数以万计的探针分子以及对杂交信号进行的检测分析变得切实可行, 是高效地大规模获取相关生物信息的主要手段。基因表达谱、蛋白质谱等芯片数据的生物信息学分析, 成为在基因转录、表达水平研究临床疾病的分子机制、疾病诊断和药物筛选的重要领域。目前模式识别、人工智能、统计学中的多种方法, 如聚类分析<sup>[36]</sup>, 人工神经网络<sup>[37]</sup>, 隐马尔可夫模型<sup>[38]</sup>等, 已被用于在核酸和蛋白质两个层次上对基因表达谱, 即基因表达矩阵(行表示基因, 列表示实验样本)集合、分类及优化等信息的处理。并应用到肿瘤分型、肿瘤分类、基因功能研究、通路(pathway)分析、基

因调控网络构建、药物靶位识别等许多方面。对86例肺癌患者基因表达谱芯片的生物信息学分析发现数百个基因与癌细胞显著相关, 属于细胞分裂、蛋白降解、嘧啶与嘌呤代谢、氧化磷酸化等通路<sup>[39]</sup>, 从信号通路调节异常的分析中则可预测肿瘤表型<sup>[40]</sup>。在神经网络等传统方法得到很多应用的同时, 统计学习理论(statistical learning theory, SLT), 即专门用于研究小样本情况下机器学习规律的理论日益受到重视, 以支持向量机(SVM)<sup>[41]</sup>方法为代表的SLT方法将为芯片的生物信息学分析提供新的途径, 从而进一步推动人们在基因组水平上以系统的、全局的观念去研究疾病多层次的现象及其本质。

## 6 分子调控网络建模

基因的结构或种类决定物种, 基因的功能或表达则决定生命的健康、疾病等状态。基因调控网络、蛋白调控网络、代谢网络等分子调控网络的研究, 是理解基因组功能、进而理解复杂疾病本质正在发展的方向, 并将为复杂性疾病多基因之间的关系、基因型-表型各部分、各层次的相互作用、调控通路提供背景和依据<sup>[42]</sup>。其中在转录组层次上发展的基因调控网络建模方法可提供与表型相关基因调控网络的部分信息。在Promoter区的调控元件可提供基因之间相互作用的线索。随着基因组数据的指数式增长, 有关生理、病理数据库快速发展, 如基因表达有关的数据库<sup>[43]</sup>, 蛋白质序列数据库有PIR<sup>[44]</sup>, Swiss-Prot<sup>[45]</sup>; 蛋白质结构数据库有PDB<sup>[46]</sup>等, 以及选择性剪接数据库<sup>[47]</sup>等。数据的大量积累也使得从系统水平上研究分子调控网络成为可能。

对于基因调控、细胞信号传导过程等已具有大量的分子生物学实验研究, 急需对实验结果进行理论总结。基因、蛋白等调控网络的建模, 即综合生理病理相关的基因、SNPs、基因表达状况、蛋白质功能状态以及临床治疗等信息, 以系统方法将不同的测量数据、各种因素的辨识, 各个层次上的相互作用关系进行整合, 利用数学模型深入了解生物的结构和功能以及生理病理过程。目前分子调控网络目前大多为简单系统、局部网络的基础研究, 以及从大规模基因表达谱中发现和描述基因调控网络的研究。基因调控网络建模主要在于代谢网络<sup>[48]</sup>、信号通路网络<sup>[49]</sup>、生化网络<sup>[50]</sup>、运用数据挖掘方法构建人类基因表达网络<sup>[51]</sup>、运用多元回归分析构建DNA微阵列数据基础上构建基因调控网络<sup>[52]</sup>、神经网络<sup>[53]</sup>等。按控制论的基本原理, 我们曾归纳出基因调控过程中的7种典型控制环节, 基因调控和信号传导路径可以由这些控制环节组合而成, 控制论的研究有助于寻找其中的共同规律<sup>[54]</sup>。通过基因组、转录组等层次多种信息相互印证, 则有望扩充已知基因调控网络的方法。

随着系统建模各种手段的发展, 尤其是复杂系统仿真、建模等方法的建立, 表明目前已有能力与方法



将复杂的生物系统问题“降幂”处理. 依据一个复杂系统的输入(遗传物质的差异)和输出(基因表达谱、蛋白质谱)确定各种变量之间的因果关系, 有望逐步建立与疾病密切相关的分子调控网络, 从而最终解释复杂疾病的成因、治疗等各种理论问题. 也将为降低复杂疾病有关信息分析的难度, 减少实际观测样本量的限制提供依据.

## 7 中医药生物信息学

中医药学植根于临床实践, 防治众多常见疾病具有较佳的疗效, 是世界医学不可或缺的组成部分. 然而长期以来研究策略与方法的局限, 制约了中医药治疗规律和疗效机制的探讨. 将侧重于宏观的中医药学及其诊疗特色、丰富资源与侧重于微观的生物信息学进行有机结合, 开展“中医药生物信息学”(traditional chinese medicine bioinformatics, TCMB)有关理论与方法的研究, 是我们提出的一个充满挑战和机遇的方向<sup>[55]</sup>. 我们的研究表明, 以生物信息学的有关理论与方法为桥梁, 在中医学研究中发展相应的信息分析与整合手段, 将有助于深入了解以整体观、辨证论治为核心的中医诊疗规律; 一套行之有效的中医药生物信息分析方法, 也将为在分子水平上发掘中医药的系统内涵, 在系统层次上加深对于复杂性疾病的理解提供新的途径.

**7.1 中医证候生物信息分析** 由于中医学对人体体质因素、环境因素及疾病不同阶段证候演变的整体认识方法, 使得在微观层面上研究中医学诊疗机制, 必然需要大量的生物信息分析, 特别是非线性规律的分析尤为突出. 中医学对疾病的观察体现出机体与环境相交融的整体观念. 对空间的“证”、时间的“候”进行证候学判断, 从而指导方药的治疗则是中医临床的核心特点. 我们运用控制论方法与中医理论相结合, 已初步揭示在机体与环境、机体内多因素相互作用基础上的稳态机制和系统特性<sup>[56, 57]</sup>. 通过“降维升阶”等处理, 则有助于从复杂的四诊信息、理化信息以及多层次生物信息中, 使主要证候因素得以辨识<sup>[58, 59]</sup>. 目前国际上认为, 揭示复杂疾病机制的新途径, 在于了解亚细胞、细胞、组织、器官及系统结构中的蛋白质相互作用, 以及认识基于相互作用的疾病不同状态<sup>[60]</sup>, 而多学科的协作、有效的信息整合, 其意义超过了单纯的基因研究<sup>[61]</sup>. 我们开展的中医证候与复杂性疾病有关病理、生理多层次信息的综合研究<sup>[62]</sup>, 也符合了这一发展趋势.

**7.2 中药药效系统学研究** 中药成分相对复杂, 治疗疾病时往往通过不同环节发挥整体调节作用<sup>[59]</sup>. 针对方剂、证候高维小样本数据, 我们建立了统计模式识别分析的PARM算法. 应用于评价中药不同配比的分析与优化、寒热方剂的作用、寒热证候的特征等, 取得了较好效果. 与统计学方法相比, 该模型可合理利用启发式的直观信息, 适合于药效的特征提取、系统评价, 而不仅是给出差异性的比较结果. 表明“中药药效系统学”

是符合中药作用特色的研究途径.

**7.3 中医药与复杂疾病研究的互补** 中医药在治疗上注重功能调节, 可能是在调控疾病的相关(易感)基因的表达及表达产物上发挥重要作用, 已发现中药可以影响一些细胞因子、组织损伤酶的比例<sup>[63]</sup>、动态变化等. 中药的作用具有多因微效基础上的突现特点, 在一定意义上符合多基因病的形成特征及治疗趋势. 因此, 充分发挥生物信息学计算、设计的作用, 在计算与实验相结合的研究框架下, 进行基于多层次生物信息分析的中药有效分子组合筛选, 中药生物信息与化学信息相关性研究, 以及中药基因组学等研究, 对于复杂疾病的药物设计及防治具有较大价值; 同时, 以确有疗效、成分明确的中药为探针, 可望开启复杂疾病机制研究中“以药测病”的思路, 从新的角度扩充疾病相关的分子调控网络<sup>[62]</sup>, 并促进生物信息、医学信息的融合.

总之, 生物信息学掌握着基因组的真正用途, 并将引起生物医学以及临床诊疗的革命性变化<sup>[64]</sup>. 作为当今生命科学研究最重要的平台技术, 生物信息学不仅能够分析复杂疾病多种生物分子数据, 同时更适于综合多种生物分子及其相互作用的知识来了解生物系统的功能, 由获取有关生物知识迈进到对生命基本规律的认识, 并促进复杂性疾病的研究向功能、系统的方向发展.

## 8 参考文献

- 1 李衍达. 以信息系统的观点了解基因组. 电子学报 2001;29:1731-1734
- 2 Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science* 2002; 295:1662-1664
- 3 李衍达. 信息与生命. 化学通报 2001;10:601-607
- 4 Bayat A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. *BMJ* 2002;324:1018-1022
- 5 Bray NJ, Owen MJ. Searching for schizophrenia genes. *Trends Mol Med* 2001;7:169-174
- 6 Ulfgren AK, Grondal L, Lindblad S, Khademi M, Johnell O, Klareskog L, Andersson U. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Ann Rheum Dis* 2000;59:439-447
- 7 Warner TT, Schapira AH. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53(Suppl 3):S16- S23
- 8 Augenlicht LH, Heerdt BG, Mariadason JM, Yang W, Wilson AJ, Fragale A, Velcich A. Environment-gene interactions in intestinal cancer. *Eur J Cancer Prev* 2002;11(Suppl 2):S12-S17
- 9 Felsenfeld S. Finding susceptibility genes for developmental disorders of speech: the long and winding road. *J Commun Disord* 2002;35:329-345
- 10 Lazzeroni LC, Karlovich CA. Genotype to phenotype: associations, errors and complexity. *Trends Genet* 2002;18: 283-284
- 11 Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001;344:655-664
- 12 Sun FZ, Flanders WD, Yang QH, Zhao HY. Transmission/disequilibrium tests for quantitative traits. *Ann Hum Genet* 2000;64(Pt 6):555-565
- 13 Zhao H. Family-based association studies. *Stat Methods Med Res* 2000;9:563-587
- 14 Collins FS. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet* 1992;1:3-6

- 15 Patterson M. That damned elusive polygene. *Nat Rev Genet* 2000;1:86
- 16 Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516-1517
- 17 Baier LJ, Permana PA, Yang X, Pratley RE, Hanson RL, Shen GQ, Mott D, Knowler WC, Cox NJ, Horikawa Y, Oda N, Bell GI, Bogardus C. A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:R69-R73
- 18 Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000;26:163-175
- 19 Kanehisa M 著. 孙之荣译. Post-genome Informatics. 第1版. 北京: 清华大学出版社、牛津大学出版社, 2002:114
- 20 周晴, 计宏凯, 李衍达. 基于基因表达调控的进化模型. 清华大学学报(自然科学版) 2002;42:135-139
- 21 卢欣, 孙之荣, 李衍达. 基因组复杂度进化的仿真研究. 生物物理学报 2001;17:318-328
- 22 Kitano H. Computational systems biology. *Nature* 2002;420:206-210
- 23 Emahazion T, Jobs M, Howell WM, Siegfried M, Wyoni PI, Prince JA, Brookes AJ. Identification of 167 polymorphisms in 88 genes from candidate neurodegeneration pathways. *Gene* 1999;238:315-324
- 24 Kanehisa M. The KEGG database. *Novartis Found Symp* 2002;247:91-101
- 25 Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 2001;291:1224-1229
- 26 Butler D. Genomics. Are you ready for the revolution? *Nature* 2001;409:758-760
- 27 Debouck C, Metcalf B. The impact of genomics on drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:193-207
- 28 计宏凯, 季梁. 基于 SNPs 的复杂疾病基因分析和亚型分类. 第二届中国生物信息学大会论文集. 北京: 2002:6
- 29 Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003;9:755-758
- 30 Zhao LP, Li SS, Khalid N. A method for the assessment of disease associations with single-nucleotide polymorphism haplotypes and environmental variables in case-control studies. *Am J Hum Genet* 2003;72:1231-1250
- 31 Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST. dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2000;28:352-355
- 32 Brookes AJ, Lehtvaslaiho H, Siegfried M, Boehm JG, Yuan YP, Sarkar CM, Bork P, Ortigao F. HGBASE: a database of SNPs and other variations in and around human genes. *Nucleic Acids Res* 2000;28:356-360
- 33 Horton NJ, Laird NM. Maximum likelihood analysis of logistic regression models with incomplete covariate data and auxiliary information. *Biometrics* 2001;57:34-42
- 34 Albert PS, Follmann DA, Wang SA, Suh EB. A latent autoregressive model for longitudinal binary data subject to informative missingness. *Biometrics* 2002;58:631-642
- 35 Albert PS. A transitional model for longitudinal binary data subject to nonignorable missing data. *Biometrics* 2000;56:602-608
- 36 Lee JM, Sonnhammer EL. Genomic gene clustering analysis of pathways in eukaryotes. *Genome Res* 2003;13:875-882
- 37 O'Neill MC, Song L. Neural network analysis of lymphoma microarray data: prognosis and diagnosis near-perfect. *BMC Bioinformatics* 2003;4:13
- 38 Ji X, Li LJ, Sun Z. Mining gene expression data using a novel approach based on hidden Markov models. *FEBS Lett* 2003;542:125-131
- 39 Creighton C, Hanash S, Beer D. Gene expression patterns define pathways correlated with loss of differentiation in lung adenocarcinomas. *FEBS Lett* 2003;540:167-170
- 40 Graeber TG, Eisenberg D. Bioinformatic identification of potential autocrine signaling loops in cancers from gene expression profiles. *Nat Genet* 2001;29:295-300
- 41 张学工. 关于统计学习理论与支持向量机. 自动化学报 2000;26:32-43
- 42 Huang S. Rational drug discovery: what can we learn from regulatory networks? *Drug Discov Today* 2002;7(20 Suppl):S163-S169
- 43 Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000;24:236-244
- 44 Barker WC, Garavelli JS, Huang H, McGarvey PB, Orcutt BC, Srinivasarao GY, Xiao C, Yeh LS, Ledley RS, Janda JF, Pfeiffer F, Mewes HW, Tsugita A, Wu C. The protein information resource (PIR). *Nucleic Acids Res* 2000;28:41-44
- 45 Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* 2003;31:365-370
- 46 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 2000;28:235-242
- 47 Ji H, Zhou Q, Wen F, Xia H, Lu X, Li Y. AsMamDB: an alternative splice database of mammals. *Nucleic Acids Res* 2001;29:260-263
- 48 Jeong H, Tombor B, Albert R, Oltvai ZN, Barabasi AL. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature* 2000;406:651-655
- 49 Karp PD. Pathway databases: A case study in computational symbolic theories. *Science* 2001;293:2040-2044
- 50 Kitami T, Nadeau JH. Biochemical networking contributes more to genetic buffering in human and mouse metabolic pathways than does gene duplication. *Nat Genet* 2002;32:191-194
- 51 Jenssen TK, Laegreid A, Komorowski J, Hovig E. A literature network of human genes for high-throughput analysis of gene expression. *Nat Genet* 2001;28:21-29
- 52 Kato M, Tsunoda T, Takagi T. Inferring genetic networks from DNA microarray data by multiple regression analysis. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 2000;11:118-128
- 53 Pouget A, Latham P. Digitized neural networks: long-term stability from forgetful neurons. *Nat Neurosci* 2002;5:709-710
- 54 卢欣, 李衍达. 基因调控过程中的典型控制环节. 自动化学报 2000;26:638-645
- 55 Li S. Advances in TCM symptomatology of rheumatoid arthritis. *J Tradit Chin Med* 2002;22:137-142
- 56 庄永龙, 李梢, 李衍达. 基于控制论的中医四时五脏系统稳态性能仿真. 系统仿真学报 2003;15:922-926
- 57 李梢, 王永炎, 季梁, 李衍达. 复杂系统意义下的中医药学及其案例研究. 系统仿真学报 2002;14:1429-1403
- 58 李梢. 从维度与阶度探讨中医证候的特征及标准化方法. 北京中医药大学学报 2003;26:1-4
- 59 Li S, Lu AP, Jia HW. Therapeutic actions of the Chinese herbal formulae with cold and heat properties and their effects on ultrastructures of synovocytes in rats of the collagen-induced arthritis. *J Tradit Chin Med* 2002;22:290-296
- 60 Noble D. Modeling the heart-from genes to cells to the whole organ. *Science* 2002;295:1678-1682
- 61 Kiberstis P, Roberts L. It's not just the genes. *Science* 2002;296:685
- 62 李梢. 中医证候与分子网络调节机制的可能关联. 中国科学技术协会首届学术年会报告. 周光召. 面向21世纪的科技进展与社会经济发展, 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 1999:442
- 63 Li S, Lu AP, Wang YY, Li YD. Suppressive effects of a Chinese herbal medicine Qing-Luo-Yin extract on the angiogenesis of collagen induced arthritis in rats. *Am J Chin Med* 2003;31:861-866
- 64 Kim JH. Bioinformatics and genomic medicine. *Genet Med* 2002;4(6 Suppl):62S-65S



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**  
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,  
CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

